

Resistência gastrointestinal *in vitro* de *Lacticaseibacillus rhamnosus* GG em bebidas de maracujá adicionadas de soro

In vitro gastrointestinal resistance of *Lacticaseibacillus rhamnosus* GG in passion fruit drinks added with whey

Resistencia gastrointestinal *in vitro* de *Lacticaseibacillus rhamnosus* GG en bebidas de maracuyá adicionadas con suero de leche

Recebido: 10/11/2022 | Revisado: 22/11/2022 | Aceitado: 23/11/2022 | Publicado: 01/12/2022

Gustavo dos Santos Emiliano

ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-1684-1253>
Instituto Federal do Sudeste de Minas Gerais, Brasil
E-mail: gustavodseemiliano@gmail.com

Raquel Amaral Cunha

ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-5628-6421>
Instituto Federal do Sudeste de Minas Gerais, Brasil
E-mail: raamaralrp@gmail.com

Camila Horta Gaudereto Rodrigues

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-0072-1583>
Instituto Federal do Sudeste de Minas Gerais, Brasil
E-mail: camilahortagau89@gmail.com

Juscinele Francisca Vieira Calsavara

ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-2929-2847>
Instituto Federal do Sudeste de Minas Gerais, Brasil
E-mail: juscinelecalavara@gmail.com

Sara Pereira Leandro

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-4117-4475>
Instituto Federal do Sudeste de Minas Gerais, Brasil
E-mail: sarapereiralenadro81@gmail.com

Daiana Júnia de Paula Antunes

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-4585-6887>
Instituto Federal do Sudeste de Minas Gerais, Brasil
E-mail: daianajunia@live.com

Renata Cristina de Almeida Bianchini Campos

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-9743-4141>
Instituto Federal do Sudeste de Minas Gerais, Brasil
E-mail: renata.campos@ifsudestemg.edu.br

Eliane Maurício Furtado Martins

ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-7621-5575>
Instituto Federal do Sudeste de Minas Gerais, Brasil
E-mail: eliane.martins@ifsudestemg.edu.br

Maurilio Lopes Martins

ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-8494-0873>
Instituto Federal do Sudeste de Minas Gerais, Brasil
E-mail: maurilio.martins@ifsudestemg.edu.br

Resumo

Alimentos contendo soro de leite em sua formulação são difundidos em diversas partes do mundo. Assim, objetivou-se avaliar a resistência gastrointestinal simulada *in vitro* de *Lacticaseibacillus rhamnosus* GG (LGG) em bebidas de maracujá adicionadas de soro. Foram elaboradas bebidas com 6% e 11% de soro em pó, acrescidas de polpa de maracujá e do probiótico, sendo as mesmas avaliadas quanto às características microbiológicas, viabilidade de LGG ao longo da vida de prateleira, resistência de LGG às condições gastrointestinais simuladas *in vitro* e características físico-químicas. As bebidas apresentaram qualidade microbiológica satisfatória e o probiótico manteve-se viável durante todo o período de armazenamento, com valores de contagem superiores a 7,91 Log UFC/mL. Após a simulação *in vitro* do trato gastrointestinal constatou-se que *L. rhamnosus* GG apresentou maior resistência quando veiculado na bebida que continha 6% de soro, o que pode ser devido a menor saturação no meio, quando comparado com a formulação que continha 11%. A qualidade físico-química das bebidas estava adequada, com resultados coerentes tanto em relação à formulação quanto ao tempo de armazenamento. Portanto, as bebidas desenvolvidas apresentam potencial para utilização comercial e diversificação da linha de alimentos contendo soro e probiótico.

Palavras-chave: Alimento funcional; Coproduto lácteo; Fruta tropical; Probiótico; Ensaio *in vitro*.

Abstract

Foods containing whey in their formulation are widespread in different parts of the world. Thus, the objective of this work was to evaluate the *in vitro* simulated gastrointestinal resistance of *Lactocaseibacillus rhamnosus* GG (LGG) in passion fruit drinks added with whey. Beverages with 6% and 11% whey powder were prepared, added with passion fruit pulp and probiotic, and they were evaluated for microbiological characteristics, LGG viability throughout the shelf life, LGG resistance to gastrointestinal conditions simulated *in vitro* and physicochemical characteristics. The beverages showed satisfactory microbiological quality and the probiotic remained viable throughout the storage period, with count values higher than 7.91 Log CFU/mL. After the *in vitro* simulation of the gastrointestinal tract, it was found that LGG showed greater resistance when conveyed in the beverage that contained 6% of whey, which may be due to lower saturation in the medium, when compared to the formulation that contained 11%. The physicochemical quality of the drinks was adequate, with consistent results both in terms of formulation and storage time. Therefore, the beverages developed have potential for commercial use and diversification of the food line containing whey and probiotics.

Keywords: Functional food; Dairy co-product; Tropical fruit; Probiotic; *In vitro* assay.

Resumen

Los alimentos que contienen suero de leche en su formulación están muy extendidos en diferentes partes del mundo. Así, el objetivo fue evaluar la resistencia gastrointestinal simulada *in vitro* de *Lactocaseibacillus rhamnosus* GG (LGG) en bebidas de maracuyá adicionadas con suero de leche. Se prepararon bebidas con 6% y 11% de suero en polvo, adicionadas con pulpa de maracuyá y probiótico, y se evaluaron sus características microbiológicas, viabilidad de LGG a lo largo de la vida útil, resistencia de LGG a condiciones gastrointestinales simuladas *in vitro* y características fisicoquímicas. Las bebidas mostraron una calidad microbiológica satisfactoria y el probiótico se mantuvo viable durante todo el período de almacenamiento, con valores de conteo superiores a 7,91 Log UFC/mL. Luego de la simulación *in vitro* del tracto gastrointestinal, se encontró que *L. rhamnosus* GG mostró mayor resistencia cuando se transportó en la bebida que contenía 6% de suero, lo que puede deberse a una menor saturación en el medio, cuando se comparó con la formulación que contenía 11%. La calidad fisicoquímica de las bebidas fue adecuada, con resultados consistentes tanto en la formulación como en el tiempo de almacenamiento. Por lo tanto, las bebidas desarrolladas tienen potencial para uso comercial y diversificación de la línea de alimentos que contienen suero y probióticos.

Palabras clave: Alimento funcional; Coproducto lácteo; Fruta tropical; Probiótico; Ensayo *in vitro*.

1. Introdução

O soro consiste em um coproduto lácteo obtido durante a fabricação de queijos. Por ser rico em lactose, seu descarte inadequado gera diversos impactos ambientais, principalmente, em ambientes aquáticos (Rosa et al., 2020). No Brasil, estima-se que cerca de 5 milhões e 400 mil toneladas de soro de leite são produzidas por ano, oriundos de queijos feitos em estabelecimentos que possuem inspeção federal, sendo reutilizado apenas de 50% a 60% desse volume (Milkpoint, 2021).

No Brasil, o soro é um coproduto atual e capaz de agregar valor às indústrias de alimentos. Portanto, esse coproduto deve ser melhor aproveitado, uma vez que, possui alto valor nutricional e funcional, sendo capaz de gerar retornos econômicos para as indústrias que o utilizam, devido ao seu potencial para a produção de diferentes bioprodutos (Karim; Aider, 2022). Além disso, as alternativas que minimizem os efeitos da poluição ambiental são crescentes e tornam-se cada vez mais necessárias.

Alimentos oriundos de laticínios colaboram para a resistência dos probióticos ao suco gástrico, por seu efeito tamponante e protetor, podendo também conferir proteção aos microrganismos durante o armazenamento e exposição às condições adversas encontradas no trato gastrointestinal (TGI) (Rasika et al., 2021). Bebidas à base de leite, soro, frutas enriquecidas com proteínas, e polpas de frutas que mantenham o sabor e cor da fruta *in natura*, conservando sua composição nutricional e funcional estão ganhando espaço, em um nicho de mercado dominado pela indústria de suplementos proteicos, o que se deve, principalmente, às mudanças no estilo de vida do consumidor e na melhoria do sabor e textura dos novos produtos (Pimentel et al., 2021).

Estudos têm demonstrado que muitas bebidas probióticas não lácteas já estão disponíveis para os consumidores e foram consideradas boas matrizes para carrear bactérias probióticas (Champagne et al., 2018). Assim, novas matrizes carreadoras são essenciais para a obtenção de produtos probióticos com alta qualidade sensorial e aceitação pelos consumidores (Fonseca et al., 2021). O Brasil é um dos maiores produtores mundiais de frutas, sendo que o maracujá desponta como um dos mais apreciados para produção de polpas e sucos, sendo que em 2019, a produção dessa fruta chegou a 593.429 toneladas (IBGE, 2020). Por

serem ricas em vitaminas, fibras, minerais, carotenóides, flavonoides, polifenóis e açúcares, bebidas à base de maracujá podem contribuir para a resistência dos probióticos durante o armazenamento (Fonseca et al., 2021).

Muitos são os benefícios desempenhados pelos probióticos, devido aos diferentes mecanismos de ação exercidos, como: modulação do sistema imunológico; interação com a microbiota intestinal; reforço da barreira epitelial intestinal; influência em outros órgãos do organismo através do sistema imunológico e da produção de neurotransmissores (Sanders et al., 2019). Destaca-se que os benefícios à saúde são dependentes da estirpe de probiótico utilizada.

Alguns estudos demonstram ainda que indivíduos respondem satisfatoriamente a terapias com antibióticos (Routy et al., 2018) e a antidepressivos quando em tratamento associado à ingestão de probióticos (Rudzki et al., 2019). Algumas estirpes probióticas podem reduzir os efeitos adversos da terapia antitumoral, especialmente após procedimentos cirúrgicos, quimioterapia e radioterapia (Siedlecka et al., 2020). Também possuem propriedades anti-inflamatórias, prevenindo a inflamação aguda das vias aéreas devido ao aumento da produção de anticorpos (Wu et al., 2019), alterando a resposta imune associada ao estresse (Soldi et al., 2019), a obesidade (Kim et al., 2018; Lee et al., 2018) e ao diabetes (Liu et al., 2018; Khalili et al., 2019).

Dessa forma, a combinação de microrganismos probióticos com o soro, na elaboração de bebidas à base de frutas, como por exemplo, o maracujá, torna-se interessante. Em razão disso, o presente trabalho foi realizado com o intuito de avaliar a resistência gastrointestinal *in vitro* de *Lactocaseibacillus rhamnosus* GG em bebidas de maracujá adicionadas de soro.

2. Metodologia

2.1 Elaboração da polpa de Maracujá

Os frutos de maracujá em estado fitossanitário satisfatório e de maturação adequada foram adquiridos no comércio de Rio Pomba, MG. Em seguida, foram lavados em água corrente para retirada de sujidades e sanitizados em água contendo 100 mg/L de cloro ativo, por 15 minutos. Posteriormente, os frutos foram lavados em água potável, e cortados ao meio para a obtenção da polpa, que foi retirada com auxílio de colher de aço inoxidável. A polpa obtida foi peneirada para remoção das sementes e congelada a -18 °C até o momento de fabricação das bebidas.

2.2 Elaboração das bebidas de maracujá adicionadas de *L. rhamnosus* GG e soro

2.2.1 Elaboração das bebidas

As bebidas foram preparadas utilizando-se duas formulações tendo como diferença a concentração de soro em pó parcialmente desmineralizado (23 gramas de carboidratos, 3,2 gramas de proteínas, 80 miligramas de sódio e 127 gramas de cálcio) fabricado pela Lactosul Indústria de Laticínios Ltda. Foram utilizadas concentrações de soro de 6% e 11%, sendo as concentrações de polpa (12,5%) e açúcar (10%) mantidas constantes conforme estabelecido por Miranda et al. (2022) (Tabela 1).

Tabela 1. Formulações utilizadas na elaboração das bebidas.

Formulação	Percentual de soro em pó diluído em água (%)	Soro em pó (g)	Água (g)	Polpa de maracujá (g)	Açúcar (g)	Volume final (g)
1	6	60	715	125	100	1000
2	11	110	665	125	100	1000

Fonte: Autores.

Após a pesagem do soro, açúcar e polpa, a água foi adicionada para completar a massa final de 1000 gramas. As bebidas preparadas foram transferidas para frascos Schott® estéreis de 100 mL e pasteurizadas a 90 °C por 5 segundos em banho-maria

de forma que essa temperatura no ponto frio do produto fosse alcançada. Posteriormente, as bebidas foram resfriadas e armazenadas a $\pm 6,5$ °C para adição da cultura probiótica de *L. rhamnosus* GG.

2.2.2 Obtenção da bactéria probiótica para adição nas bebidas

Inicialmente, foi adicionada, assepticamente, uma cápsula contendo 1010 células de *L. rhamnosus* GG (Culturelle®) em 300 mL de caldo de Man, Rogosa e Sharpe (MRS, Neogen, USA), o qual foi armazenado em estufa a 36 °C por 48 horas para ativação da bactéria. Em seguida, o caldo MRS foi removido por centrifugação a 7000 g, 5 °C, por 10 minutos (Thermo Fisher Scientific, Sorvall™ Stratos™ Centrifuge Series, Alemanha) e o pellet de células obtido foi adicionado em solução salina (0,85% de NaCl) para posterior lavagem, sendo o material centrifugado nas condições descritas previamente e a solução salina descartada. Posteriormente, um (1) grama do pellet foi adicionado em 100 mL de bebida recém-preparada, para que se obtivesse, aproximadamente, 1010 UFC/mL de *L. rhamnosus* GG. Em seguida, 10 mL da bebida adicionada do probiótico foi transferido para 100 mL de bebida recém-preparada, obtendo-se o produto final com, aproximadamente, 108 UFC/mL de *L. rhamnosus* GG.

2.3 Determinação da qualidade microbiológica das bebidas

A microbiota contaminante das bebidas foi avaliada pela contagem padrão de fungos filamentosos e leveduras (Beuchat; Cousin, 2001), de coliformes a 36 °C e a 45 °C (Kornacki; Johnson, 2001) e pela avaliação de *Salmonella* spp. (Andrews et al., 2021). As análises foram efetuadas em porções de 25 mL das bebidas, que foram transferidas assepticamente e homogeneizadas com 225 mL de solução salina peptonada estéril (0,85% de NaCl e 0,1% de peptona). Posteriormente, diluições decimais foram realizadas para prosseguir com o plaqueamento (Swanson et al., 2001). As análises de fungos filamentosos e leveduras foram realizadas somente nos tempos 0 e 28 dias de armazenamento, enquanto que a análise de coliformes foi realizada nos tempos zero (T0), 14 e 28 dias de armazenamento dos produtos a 6,5 °C, e a análise de *Salmonella* sp. foi realizada apenas no tempo zero (T0).

2.4 Avaliação da viabilidade de *L. rhamnosus* GG nas bebidas ao longo da vida de prateleira

A viabilidade de *L. rhamnosus* GG nas bebidas foi determinada imediatamente após a fabricação, tempo zero (T0), e nos dias 14 e 28 após armazenamento dos produtos a 6,5 °C.

A contagem de *L. rhamnosus* GG nas amostras foi realizada de acordo com Richter; Vedamuthu (2001) em Ágar (MRS) adicionado de púrpura de bromocresol e carbonato cálcio. O plaqueamento das diluições da bebida em Ágar MRS foi realizado utilizando a técnica de profundidade e as placas de Petri foram incubadas em jarras de anaerobiose a 37 °C por 72 horas. Após incubação, foi realizada a contagem de Unidades Formadoras de Colônias (UFC) para determinação da contagem da bactéria probiótica nos produtos.

2.5 Avaliação da resistência de *L. rhamnosus* GG às condições gastrointestinais simuladas *in vitro* quando veiculado nas bebidas

A avaliação da resistência de *L. rhamnosus* GG foi conduzida empregando-se um modelo *in vitro*, por meio da simulação dos sucos gástrico e entérico do trato gastrointestinal de acordo com metodologia proposta por Bedani, Rossi e Saad (2013).

Nos tempos 0 (após inoculação) e aos 14 e 28 dias de armazenamento a 6,5 °C, alíquotas de 10 mL da diluição 10⁻¹ das bebidas contendo *L. rhamnosus* GG foram transferidas em triplicata para 3 frascos schott® de 100 mL estéreis e o pH foi ajustado para 2,30 - 2,60 com HCl 1M. Em seguida, adicionou-se pepsina proveniente da mucosa do estômago de suíno (Sigma-Aldrich)

e lipase proveniente de *Penicillium camemberti* (Sigma-Aldrich) para alcançar uma concentração de 3 g/L e 0,9 mg/L, respectivamente. A mistura foi incubada a 37 °C/2 horas sob agitação de 150 rpm.

Após 2 horas, para simulação da condição entérica I, o pH foi aumentado para 5,40 - 5,70 utilizando-se uma solução alcalina pH 12,0 (150 mL de NaOH 1 M/Synth, Brasil e 14 g de NaH₂PO₄.2H₂O/Synth, Brasil por litro de água destilada) contendo bile bovina (Sigma-Aldrich) e pancreatina proveniente de pâncreas de suíno (Sigma-Aldrich) na proporção de concentração de 10 g/L e de 1 g/L, respectivamente. Os frascos foram reincubados a 37 °C por 2 horas sob agitação a 150 rpm.

Decorridas 4 horas de ensaio, iniciou-se a simulação da fase entérica II. Para tanto, o pH foi elevado para 6,80 - 7,20 utilizando a mesma solução alcalina com bile bovina e pancreatina que foram adicionadas na fase entérica I a fim de manter a concentração de 10 g/L e 1 g/L, respectivamente. Do mesmo modo, as amostras da fase entérica II foram incubadas a 37 °C durante 2 horas sobre agitação, totalizando 6 horas de ensaio.

Ao término de cada fase (2, 4 e 6 horas), alíquotas de 1 mL foram retiradas e submetidas às diluições seriadas em solução salina peptonada estéril (0,85% de NaCl e 0,1% de peptona). Após o plaqueamento e o tempo de incubação de 72 horas a 37 °C realizou-se a contagem de *L. rhamnosus* GG, conforme descrito no item 2.4.

2.6 Determinação das características físico-químicas das bebidas

As análises físico-químicas de acidez titulável, pH e sólidos solúveis totais (SST) foram realizadas no tempo zero (T₀), e nos dias 14 e 28 após armazenamento dos produtos a 6,5 °C. As análises de lactose e proteína foram realizadas somente aos 28 dias de armazenamento das bebidas a 6,5 °C. As análises foram realizadas de acordo com a AOAC (2016).

2.7 Análise estatística

Os experimentos foram conduzidos em três repetições e empregou-se Delineamento Inteiramente Casualizado (DIC). Os resultados foram analisados por meio de análise de variância (ANOVA) e teste de Tukey para comparações entre as médias ao nível de 5% de probabilidade (Tibco, 2017).

A contagem de fungos filamentosos e leveduras foi avaliada utilizando-se Esquema Fatorial 2x2 (duas formulações - 6% e 11% de soro, e dois tempos de armazenamento - 0 e 28 dias).

Os resultados de viabilidade de *L. rhamnosus* GG, pH, acidez láctica e cítrica e de SST nas bebidas foram avaliados empregando-se Esquema Fatorial 2x3 (duas formulações - 6% e 11% de soro, e três tempos de armazenamento - 0, 14 e 28 dias).

A resistência gastrointestinal simulada *in vitro* de *L. rhamnosus* GG veiculado nas bebidas foi avaliada utilizando-se Esquema Fatorial 2x3x3 (duas formulações - 6% e 11% de soro, três fases - gástrica, entérica I e entérica II e três tempos de armazenamento - 0, 14 e 28 dias).

3. Resultados e Discussão

3.1 Qualidade Microbiológica

A contagem de fungos filamentosos e leveduras foi baixa e não houve diferença ($p > 0,05$) entre as formulações e ao longo do armazenamento (Tabela 2). Os fatores determinantes para os bons resultados microbiológicos (Tabela 2) e que contribuíram para impedir a multiplicação microbiana ao longo do armazenamento incluíram a adoção das boas práticas de fabricação no processamento das bebidas, o tratamento térmico aplicado, que se mostrou altamente eficiente e o pH baixo das mesmas.

Tabela 1. Qualidade microbiológica das bebidas de maracujá adicionadas de *L. rhamnosus* GG e soro.

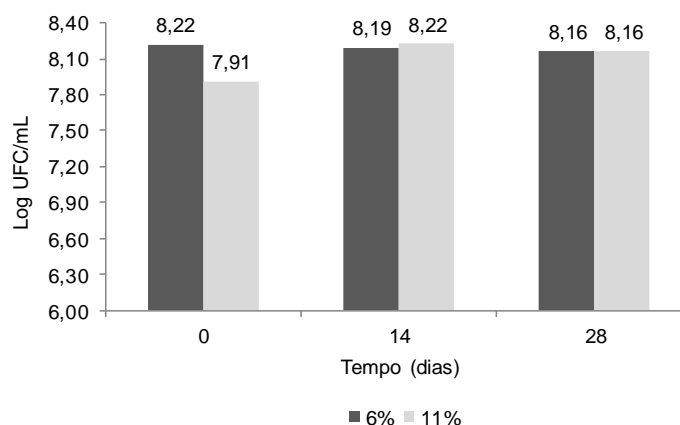
Formulações (% soro)	Fungos filamentosos e leveduras (Log UFC/mL)		Coliformes a 36°C e a 45 °C (NMP/mL)			<i>Salmonella</i> spp. (25 mL)
	Tempo (dias de armazenamento)					
	0	28	0	14	28	0
1 (6%)	2,0	2,5	< 3,0	< 3,0	< 3,0	Ausente
2 (11%)	2,1	1,3	< 3,0	< 3,0	< 3,0	Ausente

Resultados médios das análises microbiológicas considerando 3 repetições (α 0,05). Fonte: Autores.

3.2 Viabilidade de *L. rhamnosus* GG nas bebidas ao longo da vida de prateleira

A contagem de *L. rhamnosus* GG não diferiu ($p > 0,05$) entre as formulações no tempo 0, 14 e 28 dias de armazenamento (Figura 1). De acordo com a Organização Mundial de Gastroenterologia (WGO, 2017), a dose sugerida de probióticos necessária depende da estirpe e do produto utilizado; dessa forma, as doses usualmente comercializadas devem fornecer entre 1–10 bilhões de UFC/dose, o que equivale a 9,0 – 10 Log de UFC/dose.

Figura 1. Viabilidade de *L. rhamnosus* GG ao longo do tempo de armazenamento nas bebidas de maracujá adicionadas de soro. Valores representam a média de três repetições (α 0,05).



Fonte: Autores.

No presente trabalho, as bebidas desenvolvidas apresentaram contagem média de, aproximadamente, 8,0 log UFC/mL, o que demonstra uma boa adaptação de *L. rhamnosus* GG e também uma ótima estabilidade ao longo dos 28 dias de armazenamento. Desta forma, o consumo de 100 mL das bebidas poderá conferir ao consumidor valores próximos de 10 log UFC de probiótico.

A boa adaptação e estabilidade de *L. rhamnosus* GG possivelmente está associada com a matriz vegetal utilizada e com a presença do soro, visto que este produto contém nutrientes essenciais para que o probiótico estudado permaneça viável durante todo o período de armazenamento.

Moreira et al. (2017) também relataram uma boa viabilidade deste mesmo probiótico em suco misto de juçara e manga Ubá, tendo encontrado valores acima de 8,0 log UFC/mL. Furtado et al., (2018) estudaram a viabilidade de bactérias probióticas (*Lactobacillus acidophilus* LA; *Lactiplantibacillus plantarum* LP299v e *L. rhamnosus* GG) em suco tropical de manga e também

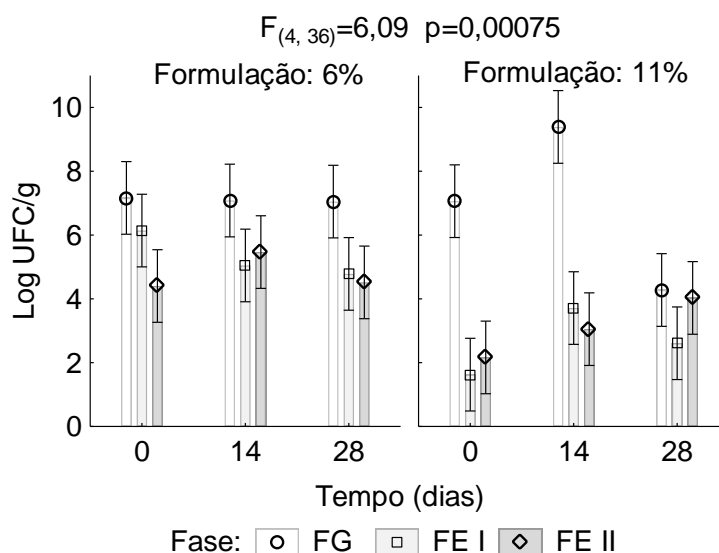
encontraram valores de contagem de *L. rhamnosus* GG próximo de 8,0 log UFC/ mL, estando semelhante aos valores obtidos no presente trabalho.

3.3 Resistência de *L. rhamnosus* GG ao trato gastrointestinal simulado *in vitro* quando veiculado nas bebidas de maracujá adicionadas de soro

A redução na contagem de *L. rhamnosus* GG ($p < 0,05$) observada entre as fases gástrica e entérica I e II na formulação que continha 11% de soro não ocorreu ($p > 0,05$) na amostra que continha 6% de soro (Figura 2), apesar de ambas terem sido submetidas às mesmas condições.

No final da simulação *in vitro* (fase entérica II), a amostra que continha 6% de soro apresentou maior ($p < 0,05$) contagem de *L. rhamnosus* GG em relação à amostra que continha 11% (Figura 2). Essa diferença pode ser explicada pelo fato deste probiótico não fermentar a lactose (Goldin et al., 1992), e, assim, ter encontrado dificuldade para se manter em um meio com maior concentração de soluto.

Figura 2. Valores médios da contagem de *L. rhamnosus* GG nas bebidas após a simulação *in vitro* das condições gastrointestinais. Os valores representam média de três repetições ($\alpha 0,05$).



Fonte: Autores.

A sobrevivência dos microrganismos probióticos ao trato gastrointestinal é dificultada por diversos fatores referentes tanto à sua resistência quanto ao ambiente intestinal, tais dificuldades estão relacionadas principalmente com a presença de enzimas na boca, com pH baixo do estômago e com a presença de bile e enzimas no intestino responsáveis pelos estresses celulares no microrganismo (Succi et al., 2005). Dessa forma, torna-se essencial a descoberta de novas matrizes alimentares que veicule bem os probióticos, auxiliando para que os mesmos cheguem ao máximo possível viáveis no intestino grosso.

Considerando que a quantidade mínima de probiótico que deve alcançar o cólon intestinal para que desempenhe funções terapêuticas seja entre 6 e 7 log UFC/mL (Madureira et al., 2011), o consumo de um mínimo de 100 mL da bebida contendo 6% de soro em pó adicionado teria o potencial para exercer tais funções.

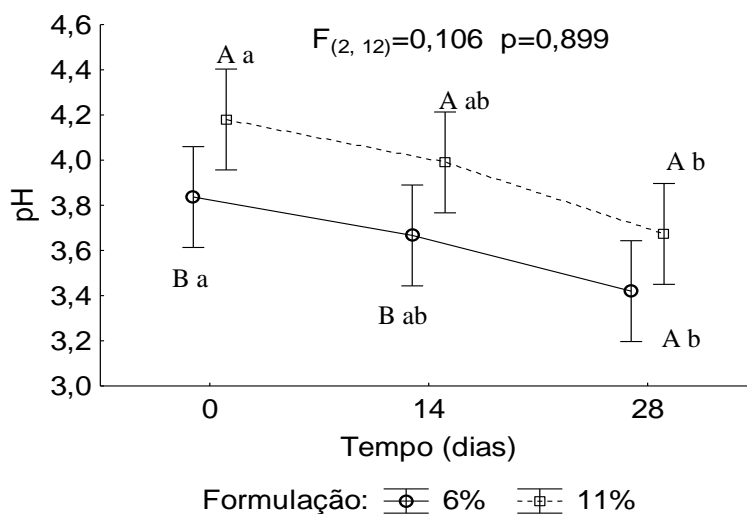
Com o intuito de verificar a confiabilidade dos resultados *in vitro* na análise de bebida de juçara com abacaxi fermentado por *L. rhamnosus* GG, Campos et al. (2019) e Pires et al. (2020) realizaram análises *in vivo* com ratos e humanos, respectivamente, e como resultados não constataram diferença ($p > 0,05$) entre esses dois métodos analíticos, o que demonstra a

confiabilidade do ensaio *in vitro* na simulação de resistência gastrointestinal de *L. rhamnosus* GG quando veiculado em bebidas de base vegetal.

3.4 Qualidade físico-química das bebidas

Em relação aos valores de pH, em ambas formulações, houve diferença ($p < 0,05$) entre os tempos 0 e 28 dias de armazenamento, ocorrendo acidificação ao longo do tempo (Figura 3).

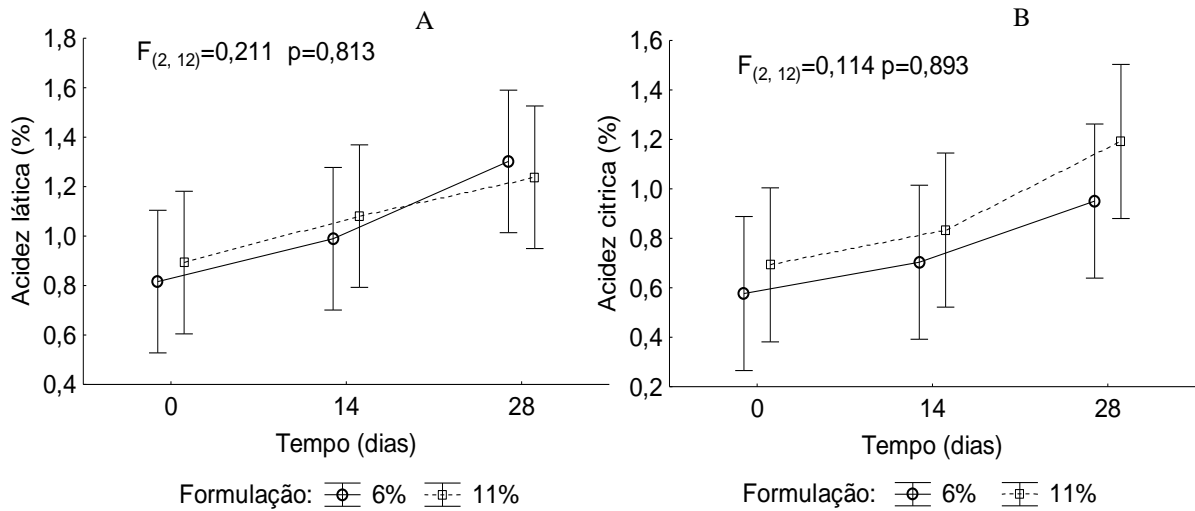
Figura 3. Variação de pH das bebidas ao longo do tempo de armazenamento a 6,5°C. Letras maiúsculas iguais indicam que não houve diferença ($p > 0,05$) entre as bebidas contendo 6% ou 11% de soro e letras minúsculas iguais indicam que não houve diferença ao longo do tempo de armazenamento.



Fonte: Autores.

Para os valores de acidez láctica e cítrica não foram encontradas diferenças significativas nos tempos 0 e 14 dias de armazenamento (6% e 11%), no entanto, aos 28 dias constatou-se diferença ($p < 0,05$) em relação aos demais tempos (Figura 4). Quando comparadas, as duas formulações não diferem ($p > 0,05$) entre si em relação a acidez láctica e cítrica, indicando que a diferença de concentração de soro não influenciou na acidez dos produtos (Figura 4A e B).

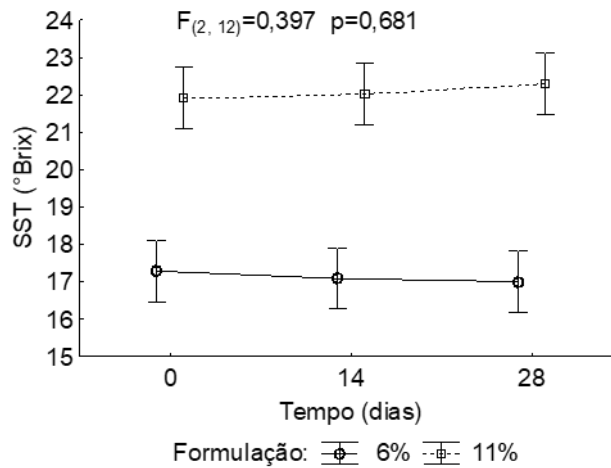
Figura 4. Acidez láctica (A) e acidez cítrica (B) das bebidas ao longo do tempo de armazenamento a 6,5 °C.



Fonte: Autores.

Em relação aos SST, como esperado, a amostra que continha 11% de soro diferiu ($p<0,05$) da amostra que continha 6% (Figura 5). Em relação ao tempo, considerando que o probiótico utilizado não fermenta a lactose, também foi coerente não haver diferença ($p>0,05$).

Figura 5. Teor de sólidos solúveis totais das bebidas ao longo do tempo de armazenamento a 6,5 °C.



Fonte: Autores.

Assim como ocorreu com SST, foi constatada diferença ($p<0,05$) para teores de lactose e proteína entre as amostras (Tabela 3). A lactose pode conferir diversos benefícios ao organismo humano, como auxiliar no controle da obesidade, melhorar a absorção de cálcio, fortificação dos ossos, dentre vários outros (Kim et al., 2018; Zhang et al., 2021). De forma semelhante, proteínas de alto valor biológico como as que estão presentes no soro de leite, podem ser altamente benéficas, o que tem aumentado a procura por alimentos contendo este nutriente (Mehra et al., 2021).

Tabela 2. Valores em percentuais de lactose e proteína das formulações avaliadas após 28 dias de armazenamento.o

Formulação (% soro)	Lactose (%)	Proteína (%)
6	3.93 a	0.85 a
11	7.28 b	1.30 b

*Médias seguidas de letras iguais nas colunas não diferem entre si ($p>0,05$). Fonte: Autores.

4. Conclusão

L. rhamnosus GG demonstrou estar viável durante todo o período de armazenamento das bebidas elaboradas a partir de polpa de maracujá e adicionadas de soro de leite e resistiu melhor às condições do trato gastrointestinal simulado *in vitro* quando veiculado na bebida que continha 6% de soro. Os parâmetros físico-químicos avaliados nas bebidas estavam adequados, com resultados coerentes tanto em relação à formulação quanto ao tempo de armazenamento. Portanto, os estudos que buscam elucidar as alternativas de utilização do soro de leite associado a alimentos com apelo funcional são de grande importância, uma vez que aliam a sustentabilidade com a busca da população por um estilo de vida saudável.

Agradecimentos

Ao Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Sudeste de Minas Gerais – Campus Rio Pomba, pelo apoio financeiro.

Referências

- Andrews, M. H., Wang, H., Jacobson, A., Ge, B., Zhang, G., & Hammack, T. S. (2021). Manual Analítico Bacteriológico (BAM). <https://www.fda.gov/food/laboratory-methods-food/bacteriological-analytical-manual-bam>.
- AOAC (2016). Association of Official Analytical Chemists. *Official methods of analysis of the Association of Official Analytical Chemists*. (20a.ed.), v.2.
- Bedani, R., Rossi, E. A., & Saad, S. M. I. (2013). Impact of inulin and okara on *Lactobacillus acidophilus* La-5 and *Bifidobacterium* animals Bb-12 viability in a fermented soy product and probiotic survival under *in vitro* simulated gastrointestinal conditions. *Food Microbiology*, 34, 382-389. <https://doi:10.1016/j.fm.2013.01.012>.
- Beuchat, I. R., & Cousin, M. A. (2021). Years and molds. In: Downes, F. P.; Ito, K. (ed.). *Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods*, (4a.ed.): *American Public Health Association-APHA*, chapter 20, p. 209-215.
- Brasil. (1999). Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Portaria n.º 398, de 30 de abril de 1999. Regulamento Técnico que estabelece as diretrizes básicas para análise e comprovação de propriedades funcionais e ou de saúde alegadas em rotulagem de alimentos. DF: Brasília, *Diário Oficial da União*.
- Brasil. (2003). Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento. Instrução normativa n.º 12, de 4 de setembro de 2003. Aprova o Regulamento Técnico para Fixação dos Padrões de Identidade e Qualidade Gerais para Suco Tropical; os Padrões de Identidade e Qualidade dos Sucos Tropicais de Abacaxi, Acerola, Cajá, Caju, Goiaba, Graviola, Mamão, Manga, Mangaba, Maracujá e Pitanga; e os Padrões de Identidade e Qualidade dos Néctares de Abacaxi, Acerola, Cajá, Caju, Goiaba, Graviola, Mamão, Manga, Maracujá, Pêssego e Pitanga. *Diário Oficial da União*, Brasília.
- Brasil. (2006). Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Secretaria de Defesa Agropecuária. Instrução Normativa n.º 68, de 12 de dezembro de 2006. Métodos Analíticos Físico-Químicos para Controle de Leite e Produtos Lácteos. Ministério da Agricultura. Brasília, DF: *Diário Oficial da União*.
- Brasil. (2013). Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa n.º19, de 19 de Junho de 2013. Estabelece a complementação dos padrões de identidade e qualidade para as bebidas. Brasília, DF: *Diário Oficial da União*.
- Campos, R. C. A. B., Martins, E. M. F., Pires, B. A., Peluzio, M. C. G., Campos, da R. A. N., Ramos, A. M., Júnior, B. R. C. L., Martins, A. D. O., Silva, R. R. S., & Martins, M. L. (2019). *In vitro* and *in vivo* resistance of *Lactobacillus rhamnosus* GG carried by a mixed pineapple (*Ananas comosus* L. Merrill) and jussara (*Euterpe edulis* Martius) juice to the gastrointestinal tract. *Food Research International*, 116, 1247-1257. <https://doi: 10.1016/j.foodres.2018.10.012>.
- Champagne, C. P., Gomes, da C. A., & Daga, M. (2018). Strategies to improve the functionality of probiotics in supplements and foods. *Current Opinion in Food Science*, 22, 160-166. <https://doi.org/10.1016/j.cofs.2018.04.008>.
- Fonseca, H. C., Melo, D. de S., Ramos, C. L., Menezes, A. G. T., Dias, D. R., & Schwan, R. F. (2021). Sensory and flavor-aroma profiles of passion fruit juice fermented by potentially probiotic *Lactiplantibacillus plantarum* CCMA 0743 strain. *Food Research International*, 152, 1-30. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2021.110710>

- Furtado, L. L., Martins, M. L., Ramos, A. M., da Silva, R. R., Junior, B. R. D. C. L., & Martins, E. M. F. (2019). Viability of probiotic bacteria in tropical mango juice and the resistance of the strains to gastrointestinal conditions simulated *in vitro*. *Semina: Ciências Agrárias*, 40, 149-162. [10.5433/1679-0359.2019v40n1p149](https://doi.org/10.5433/1679-0359.2019v40n1p149).
- Goldin, B. R., Gorbach, S. L., Saxelin, M., Barakat, S., Gualtieri, L., & Salminen, S. (1992). Survival of *Lactobacillus* species (strain GG) in human gastrointestinal tract. *Digestive diseases and sciences*, 37, 121-128. <https://doi.org/10.1007/BF01308354>.
- IBGE. (2020). Produção Agrícola Municipal. Available at: <https://sidra.ibge.gov.br/tabela/5457#resultado>.
- Karim, A., & Aider, M. (2022). Production of prebiotic lactulose through isomerisation of lactose as a part of integrated approach through whey and whey permeate complete valorisation: A review. *International Dairy Journal*, 126, 1-14. <https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2021.105249>.
- Khalili, L., Alipour, B., Jafar-Abadi, M. A., Faraji, I., Hassanilou, T., Abbasi, M., Vaghef-Mehrabany, E., & Sani, M. A. (2019). The effects of *Lactobacillus casei* on glycemic response, serum Sirtuin1 and Fetuin-A levels in patients with type 2 diabetes mellitus: a randomized controlled trial. *Iranian Biomedical Journal*, 23, 68. <https://doi.org/10.29252/23.1.68>.
- Kim, S., Huang, E., Park, S., Holzapel, W., & Lim, S. D. (2018). Physiological characteristics and anti-obesity effect of *Lactobacillus plantarum* K10. *Korean Journal for food Science Animal Resources*, 38, 554-569. <https://doi.org/10.5851/kosfa.2018.38.3.554>.
- Kornacki, J. L., & Johnson, J. L. (2001). Enterobacteriaceae, coliforms, and *Escherichia coli* as quality and safety indicators. In: Downes, F. P., Ito, K. (ed.). In: Compendium of methods for the microbiological examination of foods. 4.ed. Washington: *American Public Health Association – APHA*, p. 69-82.
- Lee, E., Jung, S. R., Lee, S. Y., Lee, N. K., Paik, H. D., & Lim, S. I. (2018). *Lactobacillus plantarum* strain Ln4 attenuates diet-induced obesity, insulin resistance, and changes in hepatic mRNA levels associated with glucose and lipid metabolism. *Nutrients*, 10, 1-15. <https://doi.org/10.3390/nu10050643>.
- Liu, W. C., Yang, M. C., Wu, Y. Y., Chen, P. H., Hsu, C. M., & Chen, C. M. (2018). *Lactobacillus plantarum* reverse diabetes-induced Fmo3 and ICAM expression in mice through enteric dysbiosis-related c-Jun NH2-terminal kinase pathways. *Plos One*, 13, 1-23. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0196511>.
- 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. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2010.09.010>.
- Milkpoint. (2021). Whey protein: como o produto do soro do leite foi de descarte poluente a um ingrediente caro. <https://www.milkpoint.com.br/noticias-e-mercado/giro-noticias/como-o-whey-protein-foi-de-descarte-poluente-a-um-ingrediente-caro-227613/>.
- Miranda, J. S., Pereira, C. V. A. C., Andrade, M. E., Vargas, S. O. E., Oliveira, M. M., Lima, D. C. N., Júnior, B. R. C. L., Ferreira, D. R., & Martins, M. L. (2022). Impact of adding milk whey, probiotic and prebiotic in passion fruit drinks. *Brazilian Journal of Development*, 8, 30484-30504. <https://doi.org/10.34117/bjdv8n4-500>
- Mehra, R., Kumar, H., Kumar, N., Ranvir, S., Jana, A., Buttar, H. S., Telessy, I. G., Awuchi, C., Okpala, C. O., Korzeniowska, M., & Guiné, R. P. F. (2021). Whey proteins processing and emergent derivatives: An insight perspective from constituents, bioactivities, functionalities to therapeutic applications. *Journal of Functional Foods*, 87, 1-17. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2021.104760>.
- Moreira, R. M., Martins, M. L., Júnior, B. R. D. C. L., Martins, E. M. F., Ramos, A. M., Cristianini, M., Campos, A. N. R., Stringheta, P. C., Silva, R. O., Canuto, J. W., Oliveira, D. C., & Pereira, D. C. S. (2017). Development of a açuara and Ubá mango juice mixture with added *Lactobacillus rhamnosus* GG processed by high pressure. *LWT*, 77, 259-268. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2016.11.049>.
- Pimentel, T. C., Gomes, L. I. O., Lourdes, E. C. M., Costa, G. N., Dias, D. R., Schwan, R. F., & Magnani, M. (2021). Understanding the potential of fruits, flowers, and ethnic beverages as valuable sources of techno-functional and probiotics strains: Current scenario and main challenges. *Trends in Food Science e Technology*, 114, 25-59. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2021.05.024>.
- Rasika, D. M. D., Vidanaratchi, J. K., Rocha, R. S., Balthazar, C. F., Cruz, A. G., Chaminda, A. S. S., & Ranadheera, C. S. (2021). Plant-based milk substitutes as emerging probiotic carriers. *Current Opinion in Food Science*, 38, 8-20. <https://doi.org/10.1016/j.cofs.2020.10.025>.
- Richter, R. L., & Vedomuthu, E. R. (2001). Milk and milk products. In: Downes, F. P., & Ito, K. (Eds.). Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods. (4a. ed.): *American Public Health Association – APHA*, p.483-505.
- Routy, B., Lechatelier, E., Derosa, L., Duong, C. O. M., Alou, M. T., Daillere, R., Fluckiger, A., Messaoudene, M., Rauber, C., Roberti, M. P., Fidelle, M., Flament, C., Poirier-Colame, V., Opolon, P., Klein, C., Iribarren, K., Mondragón, L., Jacquetot, N., Qu, B., Ferrere, G., Clemenson, C., Mezquita, L., Masip, J. R., Naltet, C., Brosseau, S., Kaderbhai, C., Richard, C., Rizvi, H., Levenez, F., Galleron, N., Quinquis, B., Pons, N., Ryffel, B., Minard-Colin, V., Gonin, P., Soria, J. C., Deutsch, E., Loriot, Y., Ghiringhelli, F., Zalcman, G., Goldwasser, F., Escudier, B., Helmann, M. D., Eggermont, A., Raoult, D., Albiges, L., Kroemer, G., & Zitvogel, L. (2018). Gut microbiome influences efficacy of PD-1-based immunotherapy against epithelial tumors. *Science*, 359, 91-97. <https://doi.org/10.1126/science.aan3706>.
- Rosa, L. P., Barros, L. de S., Souza, R. S. de., Pereira, D. H., & Cruz, L. C. C. 2020. Análise da bebida láctea de cupuaçu. *Pesquisa, Sociedade e Desenvolvimento*, 9, 1-11. <http://dx.doi.org/10.33448/rsd-v9i10.9441>.
- Rudzi, L., Ostrowska, L., Pawlak, D., Matus, A., Pawlak, K., Waszkiewicz, N., & Szulc, A. (2019). Probiotic *Lactobacillus plantarum* 299v decreases kynurenine concentration and improves cognitive functions in patients with major depression: A double-blind, randomized, placebo-controlled study. *Psychoneuroendocrinology*, 100, 213-222. <https://doi.org/10.1016/j.psyneuen.2018.10.010>.
- Sanders, M. E., Merenstein, D. J., Reid, G., Gibson, G. R., & Rastall, R. A. (2019). Probiotics and prebiotics in intestinal health and disease: from biology to the clinic. *Nature Reviews Gastroenterology e Hepatology*, 16, 605- 616. <https://doi.org/10.1038/s41575-019-0199-6>.
- Siedlecka, K. K., Daca, A., Fic, M., Wetering, T. V de., Folwarski, M., & Makarewicz, W. (2020). Therapeutic methods of gut microbiota modification in colorectal cancer management – fecal microbiota transplantation, prebiotics, probiotics, and synbiotics. *Gut Microbes*, 11, 1518-1530. <https://doi.org/10.1080/19490976.2020.1764309>.

Soldi, S., Tagliacarne, S. C., Valsecchi, C., Pernad, S., Rondanelli, M., Zivianif, L., Millerif, S., Annonig, A., & Castellazzib, A. (2019). Effect of a multistrain probiotic (*Lactoflorene® Plus*) on inflammatory parameters and microbiota composition in subjects with stress-related symptoms. *Neurobiology of Stress*, 10, 100-138. <https://doi.org/10.1016/j.yinstr.2018.11.001>.

Succi, M., Tremonte, P., Reale, A., Sorrentino, E., Grazia, L., Pacifico, S., & Coppola, R. (2005). Bile salt and acid tolerance of *Lactobacillus rhamnosus* strains isolated from Parmigiano Reggiano cheese. *FEMS microbiology letters*, 244, 129-137. <https://doi.org/10.1016/j.femsle.2005.01.037>

Swanson, K. M. J., Petran, R. L., & Hanlin, J. H. (2001). Culture methods for enumeration of microorganisms. Compendium of methods for the microbiological examination of foods, (4th ed.) *American Public Health Association*, Washington, DC, 53-62.

TIBCO Software Inc. (2017). Statistica. Version 13. *Global Leader in Integration and Analytics Software*.

World Gastroenterology Organisation - WGO. (2017). *Diretrizes Mundiais da Organização Mundial de Gastroenterologia. Probióticos e prebióticos*, 35 <https://www.worldgastroenterology.org/UserFiles/file/guidelines/probiotics-and-prebiotics-portuguese-2017.pdf>.

Wu, C. A., Lin, F. H., Lee, Y. T., Ku, M. S., & Lue, K. H. (2019). Effect of *Lactobacillus rhamnosus* GG immunopathologic changes in chronic mouse asthma model. *Journal of Microbiology, Immunology and Infection*, 52, 911-919. <https://doi.org/10.1016/j.jmii.2019.03.002>.

Zhang, S., Guo, T., Xin, Y., Qin, L., & Kong, J. (2021). Biotechnological production of d-tagatose from lactose using metabolically engineering *Lactiplantibacillus plantarum*. *LWT*, 142, 2-9.110995. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2021.110995>.