

## **Antepasto de grão de bico adicionado de *Lacticaseibacillus rhamnosus* GG: elaboração, caracterização e estudo *in vitro* da resistência gastrointestinal**

**Chickpea antipasto added with *Lacticaseibacillus rhamnosus* GG: elaboration, characterization and *in vitro* study of gastrointestinal resistance**

**Aperitivo de garbanzos adicionado con *Lacticaseibacillus rhamnosus* GG: elaboración, caracterización y estudio *in vitro* de resistencia gastrointestinal**

Recebido: 04/12/2022 | Revisado: 19/12/2022 | Aceitado: 21/12/2022 | Publicado: 24/12/2022

### **Nathalia Lanchin Barreiro**

ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-1468-440X>  
Instituto Federal do Sudeste de Minas Gerais, Brasil  
E-mail: [nathlanchin@gmail.com](mailto:nathlanchin@gmail.com)

### **Simone Vilela Talma**

ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-3416-9202>  
Instituto Federal de Sergipe, Brasil  
E-mail: [simone.talma@ifs.edu.br](mailto:simone.talma@ifs.edu.br)

### **Aurélia Dornelas de Oliveira Martins**

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-0664-7492>  
Instituto Federal do Sudeste de Minas Gerais, Brasil  
E-mail: [aurelia.dornelas@ifsudestemg.edu.br](mailto:aurelia.dornelas@ifsudestemg.edu.br)

### **Fabiana de Oliveira Martins**

ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-2424-6278>  
Instituto Federal do Sudeste de Minas Gerais, Brasil  
E-mail: [fabiana.martins@ifsudestemg.edu.br](mailto:fabiana.martins@ifsudestemg.edu.br)

### **André Narvaes da Rocha Campos**

ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-3379-871X>  
Instituto Federal do Sudeste de Minas Gerais, Brasil  
E-mail: [andre.campos@ifsudestemg.edu.br](mailto:andre.campos@ifsudestemg.edu.br)

### **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](mailto:daianajunia@live.com)

### **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](mailto: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](mailto:maurilio.martins@ifsudestemg.edu.br)

## **Resumo**

Os alimentos funcionais representam uma das tendências mais recentes para o mercado de alimentos devido à preocupação dos consumidores, que buscam um estilo de vida mais saudável associado a bons hábitos alimentares. Assim, objetivou-se elaborar e caracterizar antepasto de grão de bico adicionado de *Lacticaseibacillus rhamnosus* GG, e determinar a sobrevivência do probiótico por meio da simulação do trato gastrointestinal (TGI) *in vitro*. Para elaboração do antepasto, foram utilizados azeite, azeitona, cebola, ervas finas, grão de bico e orégano. O produto foi armazenado a 8°C para realização das análises físico-químicas, de viabilidade do probiótico bem como qualidade microbiológica e sobrevivência do probiótico ao TGI *in vitro*. A adição de *L. rhamnosus* GG alterou apenas a acidez dos antepastos. Houve estabilidade de pH, sólidos solúveis totais e % de proteína em ambos os antepastos ( $p > 0,05$ ) e não houve diferença entre as coordenadas de cor das formulações. A viabilidade do probiótico se manteve próxima a 8,0 Log UFC/g ao longo da estocagem. Verificou-se  $< 1,0 \times 10^1$  UFC/g de fungos filamentosos e Leveduras e *Enterobacteriaceae*. Durante a simulação *in vitro* do TGI, a estirpe apresentou na porção final do intestino (FEII), após oito dias de armazenamento, contagens próximas de 4,0 Log UFC/g, garantindo 6,0 Log UFC/g, se consumidos 100g do produto. A taxa de sobrevivência de *L. rhamnosus* GG foi superior a 54,11%. O probiótico apresentou ótima viabilidade no antepasto desenvolvido, indicando que a matriz poderá ser mais estudada e explorada quanto a adição de probióticos, devido ao seu potencial promissor.

**Palavras-chave:** Leguminosas; Pasta vegetal; Probiótico; Resistência gastrointestinal.

### Abstract

Functional foods represent one of the most recent trends for the food market due to the concern of consumers, who seek a healthier lifestyle associated with good eating habits. Thus, the objective was to elaborate and characterize a starter of chickpeas added with *Lacticaseibacillus rhamnosus* GG, and to determine the survival of the probiotic by simulating the gastrointestinal tract (GIT) in vitro. To prepare the antipasto, olive oil, olives, onion, fine herbs, chickpeas and oregano were used. The product was stored at 8°C to carry out physicochemical analyses, viability of the probiotics as well as microbiological quality and survival of the probiotic in the in vitro GIT. The addition of *L. rhamnosus* GG only altered the antipasti acidity. There was stability of pH, total soluble solids and % of protein in both appetizers ( $p > 0.05$ ) and there was no difference between the color coordinates of the formulations. Probiotic viability remained close to 8.0 Log CFU/g throughout storage.  $< 1.0 \times 10^1$  CFU/g of filamentous fungi and Yeasts and *Enterobacteriaceae* were found. During the in vitro simulation of TGI, the strain presented in the final portion of the intestine (FEII), after eight days of storage, counts close to 4.0 Log CFU/g, guaranteeing 6.0 Log CFU/g, if 100g of the product were consumed. product. The survival rate of *L. rhamnosus* GG was greater than 54.11%. The probiotic showed excellent viability in the antipasto developed, indicating that the matrix can be further studied and explored regarding the addition of probiotics, due to its promising potential.

**Keywords:** Legumes; Vegetable paste; Probiotic; Gastrointestinal resistance.

### Resumen

Los alimentos funcionales representan una de las tendencias más recientes para el mercado alimentario debido a la preocupación de los consumidores, quienes buscan un estilo de vida más saludable asociado a buenos hábitos alimentarios. Así, el objetivo fue elaborar y caracterizar un starter de garbanzos adicionado con *Lacticaseibacillus rhamnosus* GG, y determinar la supervivencia del probiótico mediante la simulación del tracto gastrointestinal (TGI) in vitro. Para preparar el antipasto se utilizó aceite de oliva, aceitunas, cebolla, finas hierbas, garbanzos y orégano. El producto se almacenó a 8°C para realizar análisis fisicoquímicos, viabilidad de los probióticos así como calidad microbiológica y supervivencia del probiótico en el TGI in vitro. La adición de *L. rhamnosus* GG solo alteró la acidez del antipasti. Hubo estabilidad de pH, sólidos solubles totales y % de proteína en ambos aperitivos ( $p > 0.05$ ) y no hubo diferencia entre las coordenadas de color de las formulaciones. La viabilidad del probiótico se mantuvo cerca de 8,0 Log CFU/g durante todo el almacenamiento. Se encontraron  $< 1,0 \times 10^1$  UFC/g de hongos filamentosos y levaduras y *enterobacterias*. Durante la simulación in vitro de TGI, la cepa presentada en la porción final del intestino (FEII), después de ocho días de almacenamiento, cuenta cerca de 4,0 Log UFC/g, garantizando 6,0 Log UFC/g, si se tuviesen 100 g del producto. consumido producto La tasa de supervivencia de *L. rhamnosus* GG fue superior al 54,11%. El probiótico mostró una excelente viabilidad en el antipasto desarrollado, lo que indica que la matriz puede ser más estudiada y explorada con respecto a la adición de probióticos, debido a su potencial prometedor.

**Palabras clave:** Legumbres; Pasta vegetal; Probiótico; Resistencia gastrointestinal.

## 1. Introdução

Os antepastos são alimentos práticos que podem ser consumidos como aperitivos ou petiscos antes da refeição, caracterizando-se por um ou vários pratos simples servidos como entrada e em pequenas porções (Alves et al., 2016). Uma matriz vegetal que pode ser explorada para elaboração de antepasto é o grão de bico, uma leguminosa rica em fibras, proteínas, minerais e vitaminas, e que apresenta melhor digestibilidade frente a outras leguminosas. Comparada a outras matrizes vegetais, o grão de bico apresenta 21,2% de proteína e 12,4% de fibras em 100g (Taco, 2011). Além disso, possui alta disponibilidade de ferro, sendo apontado como um alimento de valor nutricional elevado (Fagundes et al., 2013).

O grão de bico apresenta características funcionais, e esses alimentos têm ganhado adeptos, no país e no mundo, pois eles possuem além da função de nutrir, um efeito metabólico e fisiológico desejável para a manutenção da saúde gerando benefícios em quem os consome frequentemente (Birch & Bonwic, 2019). Desde que os consumidores adotaram o conceito crescente de usar alimentos para gerenciar saúde, diversas indústrias estão focando na produção de alimentos funcionais, que incluem os enriquecidos com microrganismos probióticos (Silva, 2020).

Os probióticos são microrganismos vivos que conferem benefício à saúde do hospedeiro quando consumidos em quantidades apropriadas (FAO/WHO) e, entre os benefícios destaca-se a relação entre saúde e regulação intestinal. Para beneficiar o consumidor é necessária uma concentração maior que  $10^6$  UFC/g de probióticos no produto, uma vez que esses devem resistir a acidez do estômago e, com isso, exercer sua funcionalidade (Voss, Campos & Pintado, 2021).

Recentemente, o desenvolvimento de novos produtos funcionais visa atender a demanda da sociedade atual composta por grupos distintos de consumidores que possuem ideologias, restrições alimentares, alergias ou intolerância a algum composto presente no produto. Entre esses grupos de consumidores estão aqueles intolerantes à lactose e/ou alérgicos a proteína do leite, além dos vegetarianos. É crescente o número de consumidores que necessitam de dietas e, com isso, o mercado está em expansão. Pesquisa realizada pelo IBOPE em 2012 (IBOPE, 2018) verificou um aumento de 75% da população vegetariana nas regiões metropolitanas. Essa parcela da população não consome leite e derivados e, ao mesmo tempo, não consome produtos probióticos visto que esses microrganismos são encontrados nos produtos lácteos. Diante do exposto, este estudo objetivou avaliar a elaboração, a caracterização e o estudo *in vitro* da resistência gastrointestinal de um antepasto de grão de bico adicionado de *Lacticaseibacillus rhamnosus* GG.

## 2. Metodologia

### 2.1 Elaboração de antepasto de grão de bico contendo *L. rhamnosus* GG

Para elaboração do produto, foram utilizados azeite, azeitona, cebola, ervas finas, grão de bico e orégano (Tabela 1) adquiridos no comércio local de Rio Pomba, MG e encaminhados para a Unidade de Processamento de Frutas e Hortaliças do Departamento de Ciência e Tecnologia de Alimentos Campus Rio Pomba.

**Tabela 1** - Proporções de ingredientes utilizados na elaboração do antepasto.

Ingredientes	Quantidades (%)
Azeite	18
Azeitona em conserva drenada*	7
Cebola branca	3
Ervas finas**	2
Sal	1
Alho	1
Grão de bico	67
Orégano	1
Total	100%

\*Azeitona verde, salmoura (água, sal, acidulante: ácido lático, ácido cítrico, antioxidante: ácido ascórbico, conservador: benzoato de sódio, sorbato de potássio). \*\* cebolinha, sálvia, tomilho, orégano, salsa, louro e manjeriço. Fonte: Autores.

Inicialmente, o grão de bico foi mantido imerso em 2 litros de água potável por 12 horas à temperatura de 25°C para eliminar os antinutrientes presentes e, posteriormente, foi cozido em panela de pressão por 25 minutos. A trituração do grão de bico e dos demais ingredientes foi realizada em liquidificador com adição de 100 mL da água, após a trituração, cápsulas da cultura probiótica *L. rhamnosus* GG (Culturelle) possuindo 10<sup>9</sup> UFC foram adicionadas procedendo-se o envase em frascos de vidro higienizados e fervidos. O produto foi armazenado a 8°C para realização das análises físico-químicas, de viabilidade do probiótico e microbiológicas. O antepasto controle não foi adicionado de *L. rhamnosus* GG. As análises foram realizadas em duplicata e em 3 repetições.

## **2.2 Determinação das características físico-químicas**

A fim de caracterizar o antepasto controle e contendo *L. rhamnosus* GG foram determinados o pH (Ellis, 2016), a acidez expressa em % de ácido cítrico (Clark, 2016), sólidos solúveis totais (°Brix) (Godshall, 2016), proteínas pelo método Kjeldahl (AOAC, 2000) e cor (Goyeneche et al., 2014). Essas análises foram realizadas nos tempos zero e após quatro e oito dias de elaboração dos antepastos mantidos a 8 °C em duplicata.

## **2.3 Análise instrumental de cor**

A avaliação da instrumental da cor foi realizada com o auxílio de um colorímetro portátil, seguindo o sistema Cilab (Konica Minolta CR-10, Osaka, Japão). As amostras (20g) foram colocadas em placas de petri sobre superfície de cor branca e as leituras das coordenadas L\*, a\* e b\* foram realizadas em três pontos distintos de cada amostra.

## **2.3 Viabilidade de *L. rhamnosus* GG no produto**

A viabilidade de *L. rhamnosus* GG foi avaliada nos tempos zero e após quatro e oito dias de armazenamento do antepasto a 8°C, sendo o plaqueamento das diluições feito pelo método de profundidade *Pour plate* em Agar de Man, Rogosa and Shape (MRS). Após incubação por 72 horas a 37°C (Richer & Vedamuthu, 2001), a contagem das Unidades Formadoras de Colônias (UFC) de *L. rhamnosus* GG foi efetuada para determinar a população da bactéria probiótica.

## **2.4 Avaliação da qualidade microbiológica dos antepastos**

Foram analisados fungos filamentosos e leveduras (Beuchat & Cousin, 2001), coliformes totais e termotolerantes pela técnica do Número Mais Provável (NMP/g) (Kornacki & Johnson, 2001) e ausência/presença de *Salmonella sp.* (Andrews et al., 2001) nos antepastos controle e contendo *L. rhamnosus* GG logo após o processamento (tempo zero) e após oito dias de elaboração do produto mantido a 8 °C.

## **2.5 Avaliação da resistência de *L. rhamnosus* GG ao trato gastrointestinal simulado *in vitro* quando transportado em antepasto**

A sobrevivência de *L. rhamnosus* GG ao trato gastrointestinal *in vitro* foi avaliada pela simulação das fases gástrica, entérica I e II, nos tempos zero e após oito dias de elaboração do produto. A simulação de sucos gástrico e entérico com enzimas do sistema gastrointestinal foi realizada seguindo a metodologia de Bedani, Rossi & Saad (2013). Resumidamente, 10 mL da diluição 10-1 do antepasto contendo *L. rhamnosus* GG foram transferidas para frasco Schott de 100 mL esterilizados. O pH foi medido e ajustado com HCL 1 mol/L para 2,3 - 2,6. Pepsina (isolada de mucosa gástrica de porco, Sigma-Aldrich) e lipase (Amano lipase G, isolada de *Penicillium Camemberti*, Sigma- Aldrich) foram adicionados às amostras de 10 mL das respectivas diluições para obter uma concentração de 3 e 0,9 mg/L, respectivamente. Os frascos foram incubados a 37 °C por 2h a 150 rpm sob agitação em incubadora.

Decorridas 4 horas, foi realizada a simulação do intestino grosso, correspondendo à fase entérica II. Para isso o pH foi aumentado para 6,8 - 7,2 utilizando a mesma solução tampão, bile bovina e pancreatina para manter uma concentração de 10,0 g.L-1 e 1,0 g.L-1, sendo as amostras novamente incubadas a 37°C por 2h sob agitação. No final de cada fase (gástrica, entérica I e II), alíquotas de 1 mL foram retiradas e feitas as diluições seriadas em solução salina, sendo o plaqueamento realizado em profundidade em Ágar MRS para a contagem de *L. rhamnosus* GG sobreviventes às condições gastrointestinais.

A taxa de sobrevivência de *L. rhamnosus* GG ao final do ensaio *in vitro* foi analisada conforme Guo et al. (2009), usando-se a seguinte equação:

Taxa de sobrevivência (%) =  $\text{Log UFC N1} / \text{Log UFC N0} \times 100\%$ , em que N1 = contagem de células probióticas ao final do ensaio *in vitro* e N0 = contagem de células probióticas antes do ensaio *in vitro*.

## 2.6 Análise Estatística

Os resultados das análises físico-químicas (pH, acidez total titulável, sólidos solúveis, proteína e colorimetria) foram avaliados por meio do delineamento inteiramente casualizado (DIC), em 3 repetições com duplicata para cada análise. Foi adotado esquema fatorial 2 x 3, sendo dois tratamentos (antepasto controle e contendo *L. rhamnosus* GG) e três tempos de armazenamento (0, 4 e 8 dias).

A análise da viabilidade e sobrevivência de *L. rhamnosus* GG frente à simulação *in vitro* das condições gastrointestinais, além das análises microbiológicas (fungos filamentosos e leveduras, coliformes totais e termotolerantes e *Salmonella* sp.), também foram avaliadas por delineamento inteiramente casualizado com 3 repetições. Para a viabilidade foi adotado delineamento inteiramente casualizado, comparando três tempos de armazenamento. A simulação *in vitro* do TGI foi realizada em esquema fatorial 3 x 2 sendo um tratamento (antepasto contendo *L. rhamnosus* GG), três fases (gástrica, entérica I e II) e dois tempos (0 e 8 dias).

Os resultados foram avaliados por meio de análise de variância e as médias comparadas pelo teste de Tukey à 5% de probabilidade. As análises estatísticas foram realizadas utilizando o pacote ExpDes.pt (Ferreira et al., 2013) para o software R (R-Core Team, 2021).

## 3. Resultados e Discussão

### 3.1 Caracterização físico-química e instrumental dos antepastos elaborados

Verificou-se estabilidade de pH e % de proteína ao longo de oito dias em ambos os antepastos ( $p > 0,05$ ) e não houve diferença entre eles (Tabela 2). Comparando-se o teor de proteína do antepasto desenvolvido ao de um produto vegano comercial – “pasta de grão de bico com páprica e azeite, homus mediterrâneo” constituído de grão de bico, tahine, água, azeite, sal, páprica, acidulante ácido cítrico e conservador sorbato de potássio - em que uma porção de 30 g possui 2,7g de proteína, verificou-se que o antepasto elaborado é promissor, pois fornece, aproximadamente, 12,1 g de proteína pela mesma porção, sendo 4 vezes superior ao do produto comercial, podendo ser consumido por indivíduos que buscam fontes proteicas saudáveis.

Por outro lado, constatou-se aumento significativo da acidez ( $p < 0,05$ ) ao longo do tempo de estocagem para o antepasto contendo o probiótico (Tabela 5), sugerindo que a cultura probiótica e os componentes da cápsula (frutooligossacarídeo, sacarose, maltodextrina, antioxidante ascorbato de sódio) possam ter contribuído para alterar a acidez do produto.

Não houve diferença ( $p > 0,05$ ) dos sólidos solúveis totais (°Brix) entre o antepasto de grão de bico controle e contendo *L. rhamnosus* GG durante o tempo de armazenamento. Guerra et al. (2020) também trabalharam com *L. rhamnosus* GG e não verificaram alteração dos sólidos solúveis totais (°Brix) ao longo de 28 dias de armazenamento em bebida de fruta com isolado proteico de soro.

**Tabela 2** - Valores médios e desvio padrão para as análises físico-químicas de pH, acidez (em % de ácido cítrico), proteína e sólidos solúveis dos antepastos controle e contendo *L. rhamnosus* GG nos tempos 0, 4 e 8 dias de estocagem.

Tratamento	Tempo	Ph	Acidez %	Proteína %	Sólidos Solúveis (° Brix)
<b>Antepasto Controle</b>	0 dias	6,33 ± 0,42 Aa	0,29 ± 0,03 Aa	40,89 ± 2,18 Aa	11,3 ± 0,32 Aa
	4 dias	6,25 ± 0,58 Aa	0,30 ± 0,12 Aa	41,19 ± 1,81 Aa	10,9 ± 0,15 Aa
	8 dias	6,24 ± 0,69 Aa	0,38 ± 0,09 Aa	41,18 ± 1,77 Aa	12,6 ± 1,16 Aa
<b>Antepasto Probiótico</b>	0 dias	6,30 ± 0,41 Aa	0,30 ± 0,04 Ab	43,46 ± 4,57 Aa	11,9 ± 0,12 Aa
	4 dias	5,84 ± 0,53 Aa	0,37 ± 0,07 Aab	40,92 ± 2,21 Aa	11,7 ± 0,78 Aa
	8 dias	5,35 ± 0,51 Aa	0,50 ± 0,05 Aa	40,32 ± 2,19 Aa	12,3 ± 1,21 Aa

\*Letras maiúsculas comparam os diferentes tratamentos para um único tempo e letras minúsculas comparam os diferentes tempos dentro de um mesmo tratamento. Médias seguidas da mesma letra não diferem entre si pelo Teste de Tukey à 5% de probabilidade. Fonte: Dados da pesquisa.

Apesar do pH do grão-de-bico cru e do antepasto de grão de bico desenvolvido serem próximos à neutralidade e isso permitir o crescimento de bactérias deterioradoras, a qualidade da matéria prima e as boas práticas de fabricação empregadas, foram de suma importância para garantir a segurança do produto desenvolvido.

A acidez é uma característica de qualidade e as reações envolvidas na decomposição, formam compostos ácidos que promovem aumento da acidez do meio (Chim et al., 2013), o que ocorreu no antepasto de grão de bico contendo a cultura probiótica de *L. rhamnosus* GG que faz parte do grupo das bactérias heterofermentativas.

Avaliando as alterações químicas e nutricionais de grão-de-bico cru irradiado e submetido à cocção, Ferreira et al. (2006) encontraram teor de proteína de 26,48 g/100 g de grão de bico cozido, valor inferior ao encontrado no nosso trabalho, cujo mínimo foi 40,32 g/ 100 g do antepasto, demonstrando que a qualidade da matéria prima e as condições de processamento foram determinantes para os valores obtidos. Em relação à cor instrumental dos antepastos (Tabela 3), não houve diferença ( $p > 0,05$ ) entre as coordenadas  $L^*$ ,  $a^*$  e  $b^*$  das formulações controle e contendo o probiótico.

**Tabela 3** - Valores médios e desvio padrão da avaliação de cor ( $L^*$ ,  $a^*$ ,  $b^*$ ) dos antepastos controle e contendo *L. rhamnosus* GG nos tempos 0, 4 e 8 dias de estocagem.

Tratamento	Tempo	$L^*$	$a^*$	$b^*$
<b>Antepasto Controle</b>	0 dias	35,14 ± 4,30 Aa	2,43 ± 0,71 Aa	15,17 ± 3,71 Aa
	4 dias	41,01 ± 2,97 Aa	3,40 ± 1,11 Aa	7,70 ± 1,57 Aa
	8 dias	38,37 ± 3,59 Aa	2,87 ± 1,21 Aa	16,17 ± 5,01 Aa
<b>Antepasto Probiótico</b>	0 dias	35,88 ± 4,96 Aa	2,57 ± 0,70 Aa	15,63 ± 3,23 Aa
	4 dias	42,15 ± 2,78 Aa	3,3 ± 0,60 Aa	18,20 ± 2,02 Aa
	8 dias	39,91 ± 3,14 Aa	3,2 ± 1,32 Aa	17,53 ± 4,88 a Aa

\*Letras maiúsculas comparam os diferentes tratamentos para um único tempo e letras minúsculas comparam os diferentes tempos dentro de um mesmo tratamento. Médias seguidas da mesma letra não diferem entre si pelo Teste de Tukey à 5% de probabilidade. Fonte: Dados da pesquisa.

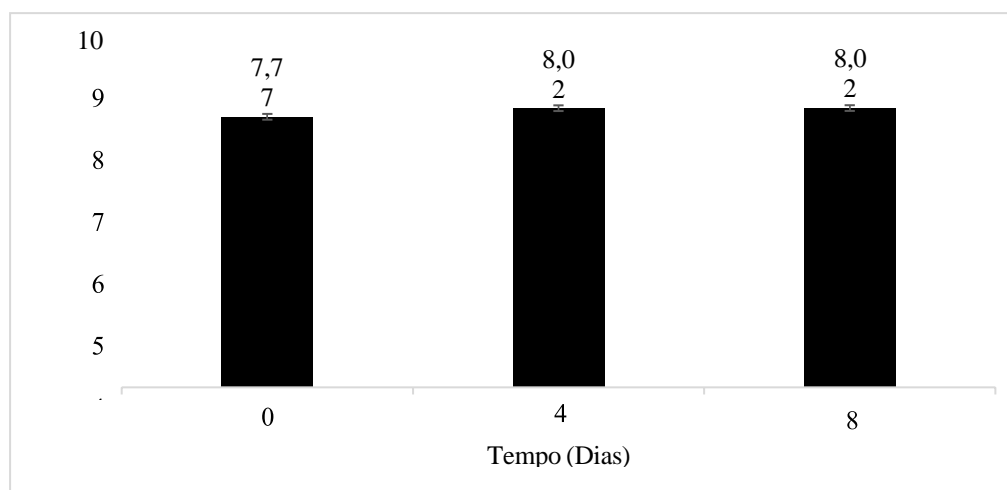


O tempo de armazenamento também não interferiu na cor do produto. Ambos os antepastos apresentaram valores de  $a^*$  e  $b^*$  positivos, com tendência a cor esverdeada, característica do grão de bico e dos condimentos adicionados à formulação. A adição de *L. rhamnosus* GG não alterou a luminosidade ( $L^*$ ) do antepasto

### 3.2. Viabilidade de *L. rhamnosus* GG no antepasto de grão de bico

A viabilidade média de *L. rhamnosus* GG (Figura 1) se manteve próxima a 8,0 Log UFC/g ao longo dos oito dias de armazenamento a 8°C ( $p > 0,05$ ), contagem suficiente para beneficiar a saúde do hospedeiro, segundo as recomendações internacionais que sugerem que um produto probiótico deve conter pelo menos  $10^6$ – $10^7$  UFC/g de bactérias probióticas ou de  $10^8$  – $10^9$  UFC por 100g de produto, para demonstrar um efeito terapêutico (Tripathi & Giri, 2014; Flach et al., 2018). Dessa forma, o antepasto de grão de bico pode ser considerado um bom veículo para a adição de *L. rhamnosus* GG.

**Figura 1** - Viabilidade de *L. rhamnosus* GG (Log UFC/g) em antepasto de grão de bico durante oito dias de armazenamento refrigerado.



\*Letras minúsculas comparam os diferentes tempos dentro de um mesmo tratamento. Médias seguidas da mesma letra não diferem entre si pelo Teste de Tukey à 5% de probabilidade. Fonte: Dados da pesquisa.

Ao adicionar microrganismos probióticos em alimentos, é importante estudar a vida de prateleira do produto e a sobrevivência da bactéria ao trato gastrointestinal (TGI), pois essas características irão determinar a funcionalidade e a aceitação do produto pelo consumidor (FLACH et al., 2018). A viabilidade deve-se manter elevada durante as etapas de processamento, armazenamento e digestão gastrointestinal, o que dependerá da estirpe, das condições da cultura, composição da matriz alimentar, pH, oxigênio dissolvido e temperatura em que o produto será armazenado (SENDRA et al., 2016; TERPOU et al., 2019).

### 3.3 Avaliação microbiológica dos antepastos elaborados

Os antepastos controle e contendo *L. rhamnosus* GG armazenados a 8 °C por oito dias apresentaram contagem de Fungos Filamentosos e Leveduras e de *Enterobacteriaceae*  $< 1,0 \times 10^1$  UFC/g do produto e ausência de *Salmonella* em 25 g. Os resultados comprovam que os produtos estavam aptos para consumo de acordo com a legislação brasileira (BRASIL, 2019) e que as boas práticas de fabricação e a higiene durante a manipulação foram essenciais para sua qualidade e segurança.

### 3.4 Sobrevivência de *L. rhamnosus* GG veiculado no antepasto de grão de bico à simulação *in vitro* do trato gastrointestinal

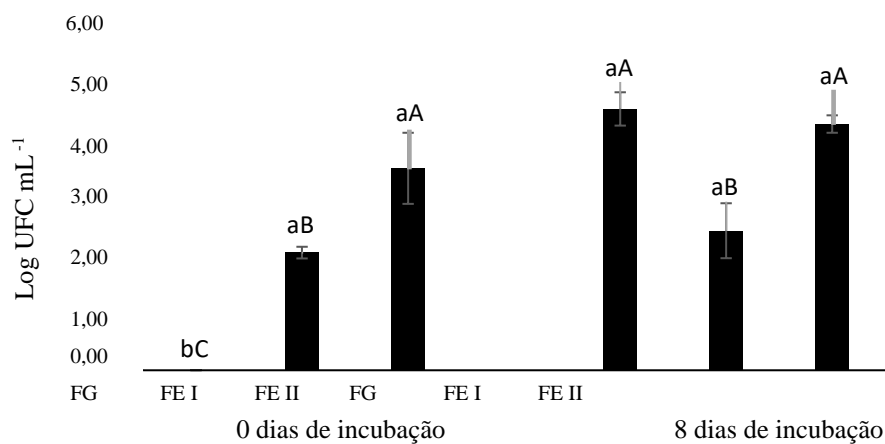
A composição nutricional e as características físico-químicas do grão de bico, com o pH próximo do ideal de crescimento da cultura são favoráveis para manter a viabilidade de *L. rhamnosus* GG. Entretanto, quando submetido às condições

adversas do TGI, na fase gástrica, com pH próximo de 2,5, ocorreu uma queda brusca de pH, não havendo viabilidade do probiótico no tempo 0 (Figura 2).

Logo após a elaboração do produto (tempo 0), observou-se aumento significativo da viabilidade entre as fases do ensaio *in vitro* o que ocorreu, provavelmente, devido ao aumento de pH entre as fases e adaptação da estirpe, que recuperou sua viabilidade (Figura 2).

Comparando-se o início com o final da vida de prateleira do antepasto (Figura 2), constatou-se aumento significativo ( $p < 0,05$ ) da viabilidade do probiótico na fase gástrica, o que sugere adaptação do probiótico no produto. Aos oito dias de estocagem verificou-se na FEII - porção final do sistema digestório - que simula o intestino grosso, aproximadamente 4,0 Log UFC/g de *L. rhamnosus* GG, sugerindo que o consumo de porções de 100 g do antepasto forneça 6,0 Log UFC do probiótico, capaz de promover benefícios ao organismo.

**Figura 2** - Contagem de *L. rhamnosus* GG (log UFC mL<sup>-1</sup>) após ensaio *in vitro*, considerando as fases gástrica (FG), Entérica I (FE I) e Entérica II (FE II) aos 0 e 8 dias de vida de prateleira. Médias seguidas por uma mesma letra não diferem entre si pelo teste Tukey à 5% de probabilidade. Letras maiúsculas indicam a comparação entre as médias do mesmo período de incubação. Letras minúsculas indicam a comparação dentro da mesma fase entre os dois períodos de incubação. Barras indicam o desvio padrão. (CV = 12,44%).



Fonte: Autores.

Os resultados deste ensaio sugerem que novos trabalhos sejam realizados estendendo-se a vida de prateleira do produto a fim de avaliar o comportamento do probiótico ao TGI após oito dias de estocagem. A técnica de microencapsulação é capaz de revestir e proteger compostos sensíveis e células vivas e mostra-se como uma opção para manter a viabilidade probiótica durante o processamento de alimentos e passagem desses microrganismos pelo TGI (De Prisco & Mauriello, 2016), podendo ser estudada.

A taxa de sobrevivência de *L. rhamnosus* GG foi analisada a fim de estimar a resistência da estirpe após o processamento e passagem pelo TGI simulado e observou-se que no final da vida de prateleira do antepasto, o probiótico apresentou taxa de sobrevivência de 54,11% na etapa (FEII), indicando a necessidade de novos métodos para a incorporação da bactéria probiótica ao antepasto de grão de bico. Portanto, os resultados encontrados neste trabalho podem impulsionar outros estudos a analisar a sobrevivência desse probiótico por meio de diferentes métodos que protejam as células do estresse causado pelo TGI, como a microencapsulação bem como o uso de prebióticos, como uma forma de proteção de *L. rhamnosus* GG aos diferentes pH's do trato gastrointestinal, garantindo maior sobrevivência da estirpe.



## 4. Conclusão

A adição de *L. rhamnosus* GG alterou apenas a acidez dos antepastos e manteve as demais características físico químicas do produto. O antepasto elaborado é uma fonte promissora de proteína vegetal, comparado a produtos similares disponíveis no mercado brasileiro.

*L. rhamnosus* GG apresentou ótima viabilidade no antepasto de grão de bico e, durante a simulação *in vitro* do trato gastrointestinal, apesar da perda de viabilidade na fase gástrica no início da vida de prateleira, a estirpe apresentou na porção final do intestino (FEII), no término da vida de prateleira, contagens próximas de 4,0 Log UFC/g, garantindo 6,0 Log UFC/g, se consumidos uma porção de 100g do produto, indicando o potencial promissor da matriz, sugerindo que esta poderá ser mais estudada e explorada quanto a adição de outros microrganismos probióticos.

## Referências

- Alves, A. N., Damasceno, K. A., Ribeiro, L. M. P., Cunha, M. F., Gonçalves, R. M. S., & Gonçalves, C. A. A. (2016). *Cartilha Técnica: Antepasto de pimenta biquinho*. Uberaba-MG: IFTM.
- Andrews, W. H., Flower, R. S., Silliker, J., & Bailey, J. S. (2001). *Salmonella*. In: Downes, F. P.; Ito, K. (eds.). Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods. (4a ed.), *American Public Health Association –APHA*, p.357-380.
- AOAC. (2000). Association Of Official Analytical Chemists. Official Methods Of Analysis Of AOAC International. (17a ed.), *AOAC International*, Arlington.
- Bedani, R., Rossi, E. A., & Saad, S. M. (2013). Impact of inulin and okara on *Lactobacillus acidophilus* La-5 and *Bifidobacterium animalis* Bb-12 viability in a fermented soy product and probiotic survival under *in vitro* simulated gastrointestinal conditions. *Food Microbiology*, 34, 382-389.
- Beuchat, I. R., & Cousin, M. A. (2001). Years and molds. In: Downes, F. P.; Ito, K. (ed.). Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods, 4.ed. Washington, DC: *American Public Health Association-APHA*, chapter 20, p. 209-215.
- Birch, C. S., & Bonwick, G. A. (2019). Ensuring the future of functional foods. *International Journal of Food Science & Technology*, 54, 1467-85.
- Brasil. (2019). Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RDC n. 331, de 23 de dezembro de 2019. Regulamento técnico dos padrões microbiológicos de alimentos e sua aplicação. *Diário Oficial da União*, Brasília, DF.
- Clark, D. H. (2016). Fruits and Fruit Products. In: Jatimer JR., G. W. (ed.). *Official Methods of Analysis of the Association of Official Analytical Chemists international*. 20. ed. Rockville, USA: AOAC International, 37, 1-39.
- Chim, J. F., Zambiasi, R. C., & Rodrigues, R. S. (2013). Estabilidade da vitamina c em néctar de acerola sob diferentes condições de armazenamento. *Revista Brasileira de Produtos Agroindustriais*, v. 15, p. 321-327.
- De Prisco, A., & Mauriello, G. (2016). Probiotização de alimentos: um foco na ferramenta de microencapsulação. *Tendências em Ciência e Tecnologia de Alimentos*, 48, 27-39.
- Ellis, C. (2016). Vegetable Products, Processed. In: Jatimer JR., G. W. (ed.). *Official Methods of Analysis of the Association of Official Analytical Chemists international*. 20. ed. Rockville, USA: AOAC International, 42, 1-14.
- Ferreira, A. C. P., Brazaca, S. G. C., & Arthur, V. (2006). Alterações químicas e nutriç-onais do grão-de-bico (*Cicer arietinum* l.) cru irradiado e submetido à cocção. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, 26, 80-88.
- Ferreira, E. B., Cavalcanti, P. P., & Nogueira, D. A. (2013). *ExpDes.pt: Experimental Designs package* (Portuguese). R package version 1.1.2.
- Flach, J., Van Der Waal, M. B., Van De Nieuwboer, M., Claassen, E., & Larsen, O. (2018). The underexposed role of food matrices in probiotic products: reviewing the relationship between carrier matrices and product parameters. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 58, 2570-2584.
- Godshall, M. A. (2016). Sugars and Sugar Products. In: Jatimer JR., G. W. (ed.). *Official Methods of Analysis of the Association of Official Analytical Chemists international*. 20. ed. Rockville, USA: AOAC International, 44, 1-53.
- Goyeneche, R., Agüero, M. V., Roura, S., & Scala, K. DI. (2014). Application of citric acid and mild heat shock to minimally processed sliced radish: Color evaluation. *Postharvest Biology and Technology*, 93, 106-113.
- Guerra, A. C., Martins, E. M. F., Silva, R. R., Franco, F. S. C., Dias, T. M. C., & Martins, M. L. (2020). Bebida de maracujá e isolado protéico de soro adicionada de *Lactobacillus rhamnosus* GG. *Alimentos: Ciência, Tecnologia e Meio Ambiente*. 1(1).
- Guo, Z., Wang, J., Yan, L., Chen, W., Liu, X. M., & Zhang, H. P. (2009). *In vitro* comparison of probiotics properties of *Lactobacillus casei* Zhang, a potential new 49 probiotic, with selected probiotic strains. *LWT – Food Science and Technology*, 42, 1640-1646.
- Fagundes, A., Da Silva, L. H., Garcia, L., Passos, C. A., & Silva, D. A. (2013). Elaboração de Cookies Enriquecidos Com farinha de Grão-de-bico. Anais do salão internacional de ensino, pesquisa e extensão. Bagé: *Anais do SIEPE*, 5(2).

Food and Agriculture Organization and World Health Organization. (FAO/WHO). (2019). *Health and nutritional properties of probiotics in food including powder milk with live lactic acid bacteria*. <http://www.fao.org/3/a0512e/a0512e.pdf>.

IBOPE. Pesquisa De Opinião Pública Sobre Vegetarianismo, abr. 2018. <https://www.svb.org.br/2469-pesquisa-do-ibope-aponta-crescimento-historico-no-numero-de-vegetarianos-no-brasil>.

Kornacki, J. L., Johnson, J. L. (2001). Enterobacteriaceae, coliforms, and *Escherichia coli* as quality and safety indicators. In: Downes, F. P.; Ito, K. (ed.). *Compendium of methods for the microbiological examination of foods*. (4a ed.), American Public Health Association – APHA, p. 69-82.

Richer, R. L.; Vedamuthu, 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. 483-496.

Sendra, E., Sayas-Barberá, M. E., Fernández-López, J., & Pérez-Alvarez, J. (2016). Effect of food composition on probiotic bacteria viability. *Bioactive Foods Health Promotion*, 17, 257-269.

Silva, S. C. B. (2020). Chá mate adicionado de lactobacilos probióticos: viabilidade, caracterização e resistência ao trato gastrointestinal *in vitro*. Dissertação (Mestrado Profissional em Ciência e Tecnologia de Alimentos) - Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Sudeste de Minas Gerais, Rio Pomba.

TACO (2011). *Tabela Brasileira de Composição de Alimentos*. Versão 4. Unicamp.

Terpou, A., Papadaki, A., Lappa, I. K., Kachrimanidou, V., Bosnea, L. A., & Kopsahelis, N. (2019). Probióticos em sistemas alimentares: Significado e estratégias emergentes para melhorar a viabilidade e a entrega de valor benéfico aprimorado. *Nutrientes*, 11, 1591.

Voss, G. B., Campos, D.A., & Pintado, M. M. (2021). Cereal Bars Added with Probiotics and Prebiotics. *Probiotics and Prebiotics in Foods*, Chapter 11, p. 201-217.