

SOBREVIVÊNCIA DE *Leuconostoc mesenteroides* KLM6 APÓS PASSAGEM PELO TRATO GASTROINTESTINAL SIMULADO E VIABILIDADE EM BEBIDA LÁCTEA FERMENTADA COM EXTRATO HIDROSSOLÚVEL DE AVEIA SOB ARMAZENAMENTO REFRIGERADO

SILVANA DE SOUZA SIGALI¹; MARIA FERNANDA FERNANDES SIQUEIRA²; JOICE DA SILVA RAMSON³; PEDRO FERNANDES VIANA⁴; GRACIELA VOLZ LOPES⁵; ÂNGELA MARIA FIORENTINI⁶

¹Universidade Federal de Pelotas – silvanasigali@gmail.com

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

³Universidade Federal de Pelotas – joice.zootecniaufpel@gmail.com

⁴Universidade Federal de Pelotas – fernandes199921@gmail.com

⁵Universidade Federal de Pelotas – gracielaavllopes@yahoo.com.br

⁶Universidade Federal de Pelotas – angefiore@gmail.com

1. INTRODUÇÃO

As bactérias ácido-lática (BAL) são microrganismos amplamente utilizados na indústria de alimentos em função de sua capacidade de aumentar a vida útil de alimentos (FREIRE *et al.*, 2021) e, também pela sua potencial função probiótica, promovendo benefícios à saúde do hospedeiro (KHARE *et al.*, 2020).

São denominados probióticos, aqueles microrganismos que, quando administrados em quantidades adequadas, conferem benefícios à saúde (FAO/WHO, 2006; Hill *et al.*, 2014) e para que seja considerada potencialmente probiótica, as BAL devem não apenas sobreviver à passagem pelo trato gastrointestinal, mas também devem possuir a capacidade de adesão e se multiplicar no intestino (FAO/WHO, 2006).

Diversos são os benefícios que o consumo de produtos probióticos, como bebidas lácteas fermentadas, podem propiciar ao consumidor como: antagonismo contra patógenos, estimulação e modulação do sistema imune, manutenção da integridade da mucosa intestinal e alívio dos sintomas de alergias e intolerâncias (SHOKRYAZDAN *et al.*, 2017) e para que esses benefícios sejam obtidos, pesquisadores recomendam que a concentração mínima do probiótico a ser ingerida deve ser de 6 log UFC/mL ou g de alimento (GARG *et al.*, 2024).

Para que essa viabilidade seja mantida, extratos vegetais como o extrato de aveia, podem ser adicionados aos produtos fermentados, proporcionando propriedades funcionais (OZER; KIRMACI, 2010). A aveia é rica em β -glucanas, uma fibra dietética solúvel em água que apresenta função prebiótica, afetando positivamente a microbiota intestinal uma vez que atuam como substrato para multiplicação de microrganismos probióticos (ZIARNO; CICHONSKA, 2021).

Desse modo, o objetivo do trabalho foi avaliar a sobrevivência de *Leuconostoc mesenteroides* KLM6 frente a simulação do trato gastrointestinal (TGI) e viabilidade na bebida láctea fermentada, após 28 dias de armazenamento refrigerado.

2. METODOLOGIA

A bebida láctea fermentada com extrato hidrossolúvel de aveia (BLFA) foi elaborada com base na metodologia de KLAJN *et al.* (2021), com modificações. O extrato foi obtido a partir da imersão de 500 g de farelo de aveia em 750 mL de água por 1 h, seguido de lavagem, processamento com mais 750 mL de água

gelada ($\sim 8^{\circ}\text{C}$) por 2 min e filtração em tecido *voil*. A BLFA foi formulada com 36% de leite em pó integral reconstituído (12,5%), 27% de soro de leite reconstituído (8,3%), 27% do extrato de aveia e 9% de sacarose. A mistura foi submetida a tratamento térmico ($90^{\circ}\text{C}/5\text{ min}$) e resfriada a 38°C , quando foram adicionadas as culturas: *Streptococcus thermophilus* TA40 ($0,03\%$; $11,40 \pm 0,12\text{ log UFC/mL}$) e *L. mesenteroides* KLM6 (1% ; $11,01 \pm 0,03\text{ log UFC/mL}$). A fermentação ocorreu a 38°C até atingir pH 4,5–4,6 na BLFA.

A sobrevivência da cultura probiótica (*L. mesenteroides* KLM6) no trato gastrointestinal (TGI) foi avaliada seguindo a metodologia de MADUREIRA *et al.* (2011) com modificações (MASSAUT *et al.*, 2024). A BLFA foi exposta às quatro fases do trato gastrointestinal (AG – antes do gástrico; DG – depois do gástrico; D – duodeno e I – íleo). Para a fase AG, 10 mL de BLFA foi homogeneizada em 90 mL de solução salina 0,85% acidificada (pH 2,0–2,5) com HCl 1M por 30 s. Na fase DG, foram adicionados 4,5 mL de uma solução enzimática de pepsina (3 g/L em HCl 1M) e mantidos em agitação em shaker a 37°C , 130 rpm por 90 min. Para a fase D, foram adicionados 11,8 mL de solução de pancreatina (2 g/L em NaHCO_3 0,1M) e 11,8 mL de solução de sais biliares (6 g/L em NaHCO_3 0,1M) e o pH ajustado em 5,0 com NaHCO_3 0,1M e levado a agitação a 37°C , 45 rpm por 20 min. Por fim, na fase I, o pH foi ajustado para 6,5 com NaHCO_3 0,1M e incubado sob agitação a 37°C , 45 rpm por 90 min. As contagens de células sobreviventes de *L. mesenteroides* KLM6, após o TGI, foram realizadas ao final de cada uma das fases em placas de Petri com ágar MRS (0,02% de sais biliares), incubadas a $37^{\circ}\text{C}/72\text{ h}$ em anaerobiose.

A viabilidade de KLM6 durante o armazenamento refrigerado (0, 7, 14, 21 e 28 dias) da BLFA foi avaliada (APHA, 2002), com contagens em ágar MRS (0,02% de sais biliares) e incubação a $37^{\circ}\text{C}/72\text{ h}$ em anaerobiose.

Os resultados foram expressos em log UFC/mL e analisados por ANOVA ($p < 0,05$) e teste de Tukey, utilizando o software GraphPad 10.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Na simulação do TGI, *L. mesenteroides* KLM6 apresentou concentração de $10,04 \pm 0,12\text{ log UFC/mL}$ na fase antes do gástrico (AG), com leve queda até a fase do duodeno (D) ($8,26 \pm 0,05\text{ log UFC/mL}$), seguido de recuperação na fase do íleo (I), com concentração final de $9,09 \pm 0,27\text{ log UFC/mL}$ (Tabela 1), valores superiores ao recomendado ($\geq 6\text{ log UFC/mL}$) para uma efetiva ação probiótica.

Tabela 1 - Sobrevivência de *Leuconostoc mesenteroides* KLM6 no trato gastrointestinal simulado (TGI) em bebida láctea fermentada com extrato hidrossolúvel de aveia (BLFA).

Bactéria	Fases do Trato Gastrointestinal			
	AG	DG	D	I
<i>L. mesenteroides</i> KLM6	$10,43 \pm 0,12^a$	$9,23 \pm 0,05^b$	$8,26 \pm 0,05^c$	$9,09 \pm 0,27^b$

AG – Antes do Gástrico; DG – Depois do Gástrico; D – Duodeno; I – Íleo

Valores expressos em log UFC/mL

Valores expressos em média \pm desvio padrão.

Letras diferentes na mesma linha indicam diferença significativa entre os resultados ($p < 0,05$).

Ao produzirem uma bebida de aveia com adição de soro de leite, PAWLOS *et al.* (2024), testaram a viabilidade frente ao TGI das cepas *Lactocaseibacillus casei* e *Lactobacillus johnsonii*. Os resultados obtidos foram inferiores ao do presente estudo sendo entre $4,92 \pm 0,36\text{ log UFC/mL}$ a $6,71 \pm 0,19\text{ log UFC/mL}$ para *L. casei*

e $5,00 \pm 0,33$ log UFC/mL a $5,94 \pm 0,20$ log UFC/mL para *L. johnsonii*, cujos valores são considerados insuficientes para que as bactérias probióticas atuem de maneira benéfica no TGI do hospedeiro.

Quanto a viabilidade de *L. mesenteroides* KLM6 durante 28 dias de armazenamento refrigerado da BLFA, foi observada uma redução gradual das contagens. A contagem inicial foi de $11,51 \pm 0,34$ log UFC/mL, reduzindo para $9,69 \pm 0,04$ log UFC/mL aos 7 dias, $8,13 \pm 0,87$ log UFC/mL aos 14 dias, $7,00 \pm 0,26$ log UFC/mL aos 21 dias e estabilizando em $7,28 \pm 0,61$ log UFC/mL aos 28 dias, sem diferença significativa ($p > 0,05$) entre os últimos períodos.

Leuconostoc mesenteroides KLM6 manteve a viabilidade superior a 7 log UFC/mL ao longo do tempo de armazenamento da bebida, evidenciando assim, o potencial probiótico da BLFA. Em bebidas lácteas com adição de cereais, KHIDER *et al.* (2022) produziram uma bebida láctea fermentada com leite de búfala e farinha de aveia, sendo utilizadas *L. casei* e *L. paracasei*, e ambas as cepas mantiveram a viabilidade de aproximadamente 10 log UFC/g após 35 dias de armazenamento, sendo o resultado obtido superior a bebida controle (sem farinha de aveia).

4. CONCLUSÃO

Leuconostoc mesenteroides KLM6 demonstrou alta resistência às condições de estresse simuladas no trânsito gastrointestinal, com concentrações superiores a 8 log UFC/mL, além de manter viabilidade acima de 7 log UFC/mL durante 28 dias de armazenamento refrigerado da BLFA. Esses resultados confirmam seu potencial como microrganismo funcional em matrizes fermentadas à base de cereais (aveia).

Os autores agradecem o apoio financeiro da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul (FAPERGS) e do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico – CNPq.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- APHA. AMERICAN PUBLIC HEALTH ASSOCIATION. **Compendium of methods for the microbiological examination of foods**. Washington, Dc: Apha Press, An Imprint Of American Public Health Association, 2002.
- FAO/WHO. FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS - FAO; WORLD HEALTH ORGANIZATION - WHO. **Probiotics in food: health and nutritional properties and guidelines for evaluation**. Roma, 2006.
- FREIRE, T. T.; SILVA, A. L. T. e; FERREIRA, B. K. O.; SANTOS, T. M. dos. Lactic acid bacteria its characteristics and importance: review. **Research, Society and Development**, vol. 10, no. 11, p. e513101119964–e513101119964, 2021. <https://doi.org/10.33448/rsd-v10i11.19964>.
- GARG, V.; VELUMANI, D.; LIN, Y.-C.; HAYE, A. A comprehensive review of probiotic claim regulations: updates from the Asia-Pacific regions, the United States, and Europe. **PharmaNutrition**, vol. 30, p. 100423, 2024. <https://doi.org/10.1016/j.phanu.2024.100423>.
- HILL, C.; GUARNER, F.; REID, G.; GIBSON, G. R.; MERENSTEIN, D. J.; POT, B.; MORELLI, L.; CANANI, R. B.; FLINT, H. J.; SALMINEN, S.; CALDER, P. C.; SANDERS, M. E. The International Scientific Association for Probiotics and Prebiotics consensus statement on the scope and appropriate use of the term

- probiotic. **Nature reviews. Gastroenterology & hepatology**, England, vol. 11, no. 8, p. 506–14, 2014. <https://doi.org/10.1038/nrgastro.2014.66>.
- KHARE, A.; GAUR, S. Cholesterol-lowering effects of *Lactobacillus* species. **Current Microbiology**, vol. 77, no. 4, p. 638–644, 2020. <https://doi.org/10.1007/s00284-020-01903-w>.
- KHIDER, M.; NASR, N. M.; ATALLAH, K. M.; METRY, W. A. Functional UF-low and full-fat Labneh supplemented with Oats (*Avena sativa* L.) powder and probiotic bacteria. **Journal of Umm Al-Qura University for Applied Sciences**, vol. 8, no. 1-2, p. 21–32, 2022. <https://doi.org/10.1007/s43994-022-00003-8>.
- KLAJN, V. M.; AMES, C. W.; DA CUNHA, K. F.; LORINI, A.; HACKBART, H. C. dos S.; FILHO, P. J. S.; CRUXEN, C. E. dos S.; FIORENTINI, Â. M. Probiotic fermented oat dairy beverage: viability of *Lactobacillus casei*, fatty acid profile, phenolic compound content and acceptability. **Journal of Food Science and Technology**, vol. 58, no. 9, p. 3444–3452, 2021. <https://doi.org/10.1007/s13197-021-04973-1>.
- MADUREIRA, A. R.; AMORIM, M.; GOMES, A. M.; PINTADO, M. E.; MALCATA, F. X. Protective effect of whey cheese matrix on probiotic strains exposed to simulated gastrointestinal conditions. **Food Research International**, vol. 44, no. 1, p. 465–470, 2011. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2010.09.010>.
- MASSAUT, K. B.; PEREIRA, E. dos S.; MOREIRA, A. N.; SILVA, W. P. da ; FIORENTINI, Â. M. Potentially functional lactose-free ice cream with *Lactobacillus casei* CSL3, ginger, and honey. **Brazilian Journal of Microbiology**, vol. 55, no. 2, p. 1735–1744, 2024. <https://doi.org/10.1007/s42770-024-01310-4>.
- ÖZER, B.; KIRMACI, H. A. Fermented Milks | Products of Eastern Europe and Asia. **Elsevier eBooks**, p. 900–907, 2014. <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-384730-0.00123-3>.
- PAWLOS, M.; SZAJNAR, K.; ZNAMIROWSKA-PIOTROWSKA, A. Probiotic milk and oat beverages with increased protein content: survival of probiotic bacteria under simulated *in vitro* digestion conditions. **Nutrients**, vol. 16, no. 21, p. 3673–3673, 2024. <https://doi.org/10.3390/nu16213673>.
- SHOKRYAZDAN, P.; JAHROMI, M. F.; LIANG, J. B.; HO, Y. W. Probiotics: from isolation to application. **Journal of the American College of Nutrition**, vol. 36, no. 8, p. 666–676, 2017. <https://doi.org/10.1080/07315724.2017.1337529>.
- ZIARNO, M.; CICHONSKA, P. Lactic acid bacteria-fermentable cereal- and pseudocereal-based beverages. **Microorganisms**, vol. 9, no. 12, p. 2532, 2021. <https://doi.org/10.3390/microorganisms9122532>.