



UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
FACULDADE DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
DEPARTAMENTO DE NUTRIÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM NUTRIÇÃO HUMANA

LUIZA COELHO MIDLEJ

SUCO DE ARATICUM (*Annona crassiflora*) SUPLEMENTADO COM *Lactobacillus paracasei* subsp *paracasei* LBC-81: SOBREVIVÊNCIA E ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DURANTE O ARMAZENAMENTO

BRASÍLIA
2023

LUIZA COELHO MIDLEJ

SUCO DE ARATICUM (*Annona crassiflora*) SUPLEMENTADO COM *Lactobacillus paracasei* subsp *paracasei* LBC-81: SOBREVIVÊNCIA E ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DURANTE O ARMAZENAMENTO

Dissertação apresentada ao programa de Pós-Graduação em Nutrição Humana da Faculdade de Ciências da Saúde, Universidade de Brasília, como requisito para obtenção do título de Mestre em Nutrição Humana.

Orientadora: Profa. Dra. Eliana dos Santos Leandro
Co-orientadora: Profa. Dra. Sandra Fernandes Arruda

BRASÍLIA
2023

LUIZA COELHO MIDLEJ

SUCO DE ARATICUM (*Annona crassiflora*) SUPLEMENTADO COM *Lactobacillus paracasei* subsp *paracasei* LBC-81: SOBREVIVÊNCIA E ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DURANTE O ARMAZENAMENTO

Dissertação apresentada ao programa de Pós-Graduação em Nutrição Humana da Faculdade de Ciências da Saúde, Universidade de Brasília, como requisito para obtenção do título de Mestre em Nutrição Humana.

Aprovada em:

MEMBROS DA BANCA:

Profa. Dra. Eliana dos Santos Leandro
(Presidente da Banca – Universidade de Brasília)

Profa. Dra. Raquel Braz de Assunção Botelho
(Membro Interno – Universidade de Brasília)

Profa. Dra. Sascha Habu
(Membro Externo – Universidade Tecnológica Federal do Paraná)

Profa. Dra. Wilma Maria Coelho Araújo
(Suplente – Universidade de Brasília)

BRASÍLIA
2023

Luiza Coelho Midlej

Suco de Araticum (*Annona crassiflora*) Suplementado com *Lactobacillus paracasei* subsp *paracasei* LBC-81: Sobrevivência e Atividade Antioxidante Durante o Armazenamento/ Luiza Coelho Midlej

Dissertação de mestrado/ Faculdade de Ciências da Saúde, Universidade de Brasília.

Brasília, 2023.

Área de concentração: Nutrição Humana

Orientadora: Dra Eliana dos Santos Leandro

Coorientadora: Dra Sandra Fernandes Arruda

Araticum; *Annona Crassiflora*, *Lactobacillus Paracasei* subsp *paracasei* LBC 81; Sobrevivência; Viabilidade, Atividade antioxidante; Estresse gastrointestinais in vitro.

AGRDECIMENTOS

Atuando durante dez anos na área clínica da Nutrição, com atendimentos e pós-graduações voltadas a esse nicho, ingressar na área acadêmica e da pesquisa era uma vontade guardada durante esse tempo. Finalmente decidi que era hora de tentar. Quando li o edital, enxerguei a oportunidade de trabalhar com um tema que muito me agradava: probióticos. Sem acreditar que daria certo, enviei os documentos. Fiquei muito feliz com a notícia da aprovação.

O que eu não contava era que o contexto não seria tão favorável. Em meio a uma pandemia, meu filho de 4 anos, na época, teve as aulas suspensas, e assistir as matérias em casa foi um desafio grande. O meu trabalho em consultório não parou e sempre demandou muito. Trabalhar e fazer mestrado não é uma tarefa fácil. Ainda mais quando no meio disso tudo, a vida resolve nos surpreender com uma mudança de cidade muito desejada, mas que na prática, representou um desafio ainda maior.

Chegar até aqui só foi possível devido ao apoio imenso que recebi da minha família. Minha mãe que nunca deixou de me incentivar. Meu pai que cuidou do meu filho enquanto eu passava horas do dia no laboratório. Meus avós que me deram todo o suporte. Era lindo enxergar o orgulho que eles sentiam. Meu esposo, que mesmo passando por um curso de formação intenso me apoiou e nunca me deixou desistir.

No meio disso tudo, Deus escolheu a dedo a orientadora para me acompanhar nessa caminhada. Uma profissional detentora de um conhecimento ímpar, um planejamento e organização para orientar que foram fundamentais para concluirmos todas as etapas. A sua paciência inabalável para nos passar os conhecimentos, mesmo em meio a tantas novidades. Prof.a Dra. Eliana Leandro tem o dom de ensinar! Mas acima de tudo tem uma humanidade inigualável, sempre preocupada com a nossa saúde emocional.

As colegas que encontrei no grupo de pesquisa também tenho certeza que foram colocadas por Deus no meu caminho. Maria Carolina Mesquita que nos transmitiu muitos conhecimentos, sempre com paciência e carinho. Também, Carla Celino e Clarissa Dantas, que se tornaram grandes amigas, agradeço imensamente pela parceria durante todo o mestrado.

Quero agradecer a Prof.a Dra. Sandra Arruda, minha coorientadora, profissional extremamente competente e de um conhecimento admirável. Obrigada por todos os ensinamentos transmitidos. Agradeço a Thais Amanda Silva e Luiz Eduardo Araújo,

que com todo amor ao que fazem, foram fundamentais para eu conseguir concluir uma das etapas mais desafiadoras do trabalho. Admiro muito a dedicação e a inteligência de vocês.

Muito obrigada a todos vocês que fizeram parte dessa caminhada enriquecedora e transformadora!

RESUMO

Introdução: A fim de atender ao mercado em ascensão de probióticos em matrizes não lácteas (veganos, intolerantes e alérgicos a lácteos), os sucos de frutas vêm sendo estudados como veículo probiótico. Tais bebidas são ricas em fibras e compostos fenólicos que proporcionam atividade antioxidante. Porém, o baixo pH e a alta acidez podem representar um desafio à viabilidade do microrganismo probiótico. O araticum é uma fruta típica do Cerrado com alto valor nutricional e apesar de seu grande potencial funcional já explorado, não existem estudos que o avaliem como matriz probiótica. O *Lactobacillus paracasei* subsp *paracasei* LBC-81 é uma cultura comercial com benefícios à saúde do ser-humano já conhecidos, que incluem a melhora do funcionamento intestinal e atenuação de sintomas relacionados ao estresse e ansiedade. Foi estudada em diversas matrizes alimentares demonstrando viabilidade. **Objetivo:** O objetivo deste estudo foi desenvolver um suco de araticum não fermentado suplementado com a estirpe probiótica *Lactobacillus paracasei* subsp *paracasei* LBC 81 durante o armazenamento e após exposição às condições gástricas e pancreáticas simuladas. **Material e Métodos:** Trata-se de um estudo experimental quantitativo e qualitativo que foi subdividido nas seguintes etapas: (1) elaboração da bebida adicionada de *Lactobacillus paracasei* subsp *paracasei* LBC 81, (2) caracterização físico-química das bebidas antes e após o armazenamento sob refrigeração, (3) análises microbiológicas durante a vida útil das bebidas, (4) determinação da sobrevivência de *L. paracasei* sob condições simuladas gastrointestinais e (5) análise de fenólicos totais e potencial antioxidante das bebidas. **Resultados e Discussão:** Os principais resultados mostraram que a viabilidade de *L. paracasei* demonstrou tendência de decréscimo nas primeiras semanas de armazenamento, mas na formulação contendo 40% de polpa, houve recuperação a partir do 14º dia. Não houve diferença significativa na sobrevivência comparando-se as três formulações. Houve redução do pH e aumento da acidez ao longo dos 28 dias indicando a ocorrência de fermentação mesmo em condições não favoráveis. Em relação à presença de fenólicos e atividade antioxidante, os sucos contendo concentrado de células apresentaram quantidades superiores significativamente quando comparados aos que não continham a bactéria. A fermentação ocorrida parece ter contribuído positivamente para esse resultado. Após a exposição ao estresse gastrointestinal simulado *in vitro*, os sucos permaneceram com alta sobrevivência. O suco gástrico foi o que menos prejudicou a bactéria e o suco intestinal e o tratamento sequencial apresentaram maior impacto na contagem de *L. paracasei*. **Conclusão:** Assim, o suco de araticum mostrou ser uma matriz carreadora viável para *Lactobacillus paracasei* subsp *paracasei* LBC-81, uma vez que apresentou contagem acima da recomendada para sua ingestão como alimento funcional probiótico (> 8 ciclos log UFC / mL) até o final do armazenamento de 28 dias. Os sucos com concentrado de células demonstraram maior quantidade de compostos fenólicos e atividade antioxidante. Sugere-se, em estudos posteriores, a realização da avaliação sensorial dos produtos.

Palavras-chave: Araticum; *Annona Crassiflora*, *Lactobacillus paracasei* subsp *paracasei* LBC 81; Sobrevivência; Viabilidade, Atividade antioxidante; Estresse gastrointestinais *in vitro*.

ABSTRACT

Introduction: To address the growing market for probiotics in non-dairy matrices (vegans, dairy intolerant, and allergic individuals), fruit juices were investigated as probiotic carriers. Such beverages are rich in dietary fiber and phenolic compounds that have antioxidant activity. However, the low pH and high acidity may pose a challenge to the viability of probiotic microorganisms. Araticum is a typical cerrado fruit with high nutritional value, and although its great functional potential has been explored, there are no studies evaluating it as a probiotic matrix. *Lactobacillus paracasei* subsp *paracasei* LBC-81 is a commercial culture with known human health benefits, including improved intestinal function and attenuation of symptoms associated with stress and anxiety. It has been studied in various food matrices and has been shown to be viable.

Objective: This study aimed to develop an unfermented Araticum juice supplemented with the probiotic strain *Lactobacillus paracasei* subsp *paracasei* LBC 81 during storage and after exposure to simulated gastric and pancreatic conditions.

Material and Methods: This is a quantitative and qualitative experimental study that was subdivided into the following steps: (1) elaboration of the beverage added with *Lactobacillus paracasei* subsp *paracasei* LBC 81, (2) physicochemical characterization of the beverages before and after storage under refrigeration, (3) microbiological analysis during the shelf life of the beverages, (4) determination of the survival of *L. paracasei* under simulated gastrointestinal conditions and (5) analysis of total phenolics and antioxidant potential of the beverages.

Results and Discussion: The main results showed that the viability of *L. paracasei* demonstrated a decreasing tendency in the first weeks of storage, but in the formulation containing 40% pulp, there was recovery from the 14th day. There was no significant difference in survival comparing the three formulations. There was a reduction in pH and an increase in acidity over the 28 days suggesting that fermentation occurred even under unfavorable conditions. Regarding the presence of phenolics and antioxidant activity, the juices containing cell concentrate showed significantly higher amounts when compared to those that did not have the bacteria. The fermentation that occurred seems to have contributed positively to this result. After exposure to simulated gastrointestinal stress *in vitro*, the juices remained with high survival. Gastric juice was the least detrimental to the bacteria, and intestinal juice and sequential treatment had the highest impact on *L. paracasei* counts.

Conclusion: Thus, araticum juice proved to be a viable carrier matrix for *Lactobacillus paracasei* subsp *paracasei* LBC-81, since it presented counts above those recommended for its ingestion as a probiotic functional food ($> 8 \log$ CFU/mL cycles) until the end of the 28-day storage. Juices with cell concentrate showed higher amounts of phenolic compounds and antioxidant activity. In further studies, it is recommended to carry out the sensory evaluation of the products.

Key Words: Araticum; *Annona Crassiflora*, *Lactobacillus paracasei* subsp *paracasei* LBC 81; Survival; Viability, Antioxidant activity; *In vitro* gastrointestinal stress.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Comportamento de *L. paracasei* LBC-81 durante 28 dias de armazenamento a 4°C (a), viabilidade de *L. paracasei* nas três formulações (F1, F2 e F3) antes do armazenamento e com 28 dias de armazenamento (b) e efeito da formulação, independente do tempo de armazenamento, na viabilidade de *L. paracasei* (c).

Figura 2. Comportamento do pH (a) e acidez titulável (b) nas três formulações de suco de araticum (F1, F2 e F3) durante 28 dias de armazenamento a 4°C, variação do pH (c) e acidez titulável (d) em suco de araticum com e sem adição da bactéria e valores de pH (e) e acidez titulável (f), independente do tempo de armazenamento, nas formulações de suco de araticum (F1, F2 e F3).

Figura 3. Quantificação de fenólicos totais em suco de araticum com 20% de polpa (a), 30% de polpa (b) e 40% de polpa (c) com e sem adição de bactéria durante 28 dias de armazenamento a 4°C.

Figura 4. Atividade antioxidante, determinada pelo método FRAP, em suco de araticum com 20% de polpa (a), 30% de polpa (b) e 40% de polpa (c) com e sem adição de bactéria durante 28 dias de armazenamento a 4°C.

Figura 5. Atividade antioxidante, pelo método DPPH, em suco de araticum (20, 30 e 40% de polpa) (a) e atividade antioxidante do suco de araticum com e sem adição de bactéria durante 28 dias de armazenamento a 4°C (b) e atividade antioxidante nas bebidas com e sem bactéria antes do armazenamento e com 28 dias de armazenamento (c).

Figura 6. Viabilidade de *L. paracasei*, independente da formulação de suco de araticum, após exposição ao suco gástrico, intestinal e exposição sequencial ao suco gástrico e intestinal (a), sobrevivência de *L. paracasei*, independente da formulação de suco de araticum, após exposição ao suco gástrico, intestinal e exposição sequencial ao suco gástrico e intestinal (b) e sobrevivência de *L. paracasei*, independente da condição de exposição gastrointestinal, nas formulações de suco de araticum (c).

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Composição nutricional do araticum por 100g pela literatura.

Tabela 2. Esquema experimental dos sucos.

Tabela 3. Composição centesimal do suco e polpa de araticum.

Tabela 4. Equações de regressão referentes à viabilidade de *L. paracasei*, pH, titulável acidez, fenólicos totais, FRAP e DPPH durante o armazenamento do suco de araticum.

LISTA DE ABREVIACÕES

ANVISA - Agência Nacional de Vigilância Sanitária

AT - Acidez titulável

AUC - Área abaixo da curva

BAL - Bactérias láticas

CHO – carboidratos ou hidratos de carbono

DCNT – Doenças Crônicas Não Transmissíveis

DSRC - Capacidade relativa de eliminação do radical DPPH●

DNA - Ácido Desoxirribonucleico

DPPH - 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl

FAO – Food and Agriculture Organization

FRAP - Fluorescence Recovery After Photo bleaching

HCl – Ácido clorídrico

H₃BO₃ – Ácido bórico

H₂SO₄ – Ácido sulfúrico

KH₂ PO₄ – Fosfato monopotássico

MRS - Man Rogosa and Sharpe

NaOH – Hidróxido de sódio

NaCl – Cloreto de Sódio

OMS – Organização Mundial da Saúde

UFC - Unidades formadoras de colônias

IgA – Imunoglobulina A

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	5
2. OBJETIVOS.....	8
2.1 OBJETIVO GERAL	8
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	8
3. REFERÊNCIAL TEÓRICO	9
3.1 Alimentos funcionais	9
3.2 Bactérias lácticas e probióticos	11
3.2.1 Bactérias lácticas	11
3.2.2 Bactérias lácticas probióticas.....	12
3.2.3 <i>Lactobacillus paracasei</i> subsp <i>paracasei</i> LBC 81	14
3.3 Sobrevivência de bactérias lácticas probióticas em bebidas elaboradas com suco de frutas.....	16
3.4 Efeito da matriz alimentar na sobrevivência de probióticos em condições gastrointestinais <i>in vitro</i>	19
3.5 Fruto do cerrado: Araticum.....	21
4. METODOLOGIA	24
4.1 Tipo de estudo.....	24
4.2. Preparo da polpa de araticum.....	25
4.3 Preparo e processamento do suco de araticum adicionado de concentrado de células de <i>L. paracasei</i> LBC 81	25
4.3.1 Preparo do suco de araticum.....	25
4.3.2 Preparo das bebidas adicionadas do concentrado de células de <i>L. paracasei</i> LBC-81	28
4.4 Análise físico-química das bebidas após pasteurização.....	28
4.4.1 Determinação da composição centesimal da polpa e da bebida de araticum. 28	
4.5 Determinação do pH e acidez titulável das bebidas após a pasteurização.....	31
4.5.1. pH.....	31
4.5.2. Acidez titulável	32
4.6 Caracterização físico-química e viabilidade de <i>L. paracasei</i> antes e durante o armazenamento	32
4.6.1 Análise da viabilidade de <i>L. paracasei</i> LBC 81	32
4.6.2 Análise de pH e acidez titulável.	33
4.7. Análise de fenólicos totais e da atividade antioxidante dos sucos.....	33
4.7.1. Fenólicos totais	33
4.7.2. Potencial antioxidante redutor do Fe (FRAP)	34
4.7.3. Capacidade de eliminação de radicais livres (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH•)).....	34
4.8. Determinação da sobrevivência de <i>L. paracasei</i> sob condições gastrointestinais <i>in vitro</i>	35
4.8.1. Simulação gástrica <i>in vitro</i> em condição estática	35
4.8.2. Simulação intestinal <i>in vitro</i> em condição estática.....	36
4.8.3. Sucessão gástrica e intestinal <i>in vitro</i> em condição estática.....	37
4.9. Análise estatística.....	37
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	38
5.1. Composição centesimal da polpa de araticum e das formulações dos sucos... 38	
5.2. Viabilidade de <i>L. paracasei</i> LBC-81 e variáveis associadas a atividade da estirpe durante o armazenamento.....	41
5.2.1. Viabilidade de <i>L. paracasei</i>	41

5.3. pH e acidez titulável.....	45
5.4. Compostos fenólicos totais e atividade antioxidante	49
5.4.1. Compostos fenólicos totais.....	50
5.4.2. Potencial antioxidante redutor do Fe (FRAP)	54
5.4.3. Capacidade de eliminação de radicais livres (DPPH)	55
5.5. Viabilidade e sobrevivência após o estresse gástrico, intestinal e sucessivo simulado.....	58
6. CONCLUSÃO	62

1. INTRODUÇÃO

O aumento das doenças crônicas não transmissíveis (DCNT) vem sendo observado no mundo. Um percentual de 71% dos óbitos globais ocorre devido a esse grupo de enfermidades, que inclui doenças cardiovasculares, câncer, doenças respiratórias e diabetes. Exercício físico regular, e uma alimentação equilibrada e balanceada exercem um importante papel na prevenção e no tratamento desses quadros. Nesse contexto, dentre outras abordagens nutricionais, os alimentos funcionais destacam-se por afetar benéficamente funções do organismo humano, sendo relevantes para a melhora do estado de saúde e bem-estar e reduzem o risco de doenças. Dentro das categorias dos alimentos funcionais, existem os “alimentos probióticos” que são bebidas ou alimentos fermentados ou acrescidos de microrganismos vivos que, quando administrados em quantidades adequadas, conferem benefício à saúde do hospedeiro (PLASEK et al., 2020; FAO/OMS,2007; FAO/OMS, 2018; BEHERA, 2020).

Nas últimas décadas, os lácteos foram as principais bases para os produtos probióticos. Diversos estudos constataram que leite, queijo, soro, iogurte são matrizes adequadas para a sobrevivência e crescimento dos microrganismos probióticos, (TURKMEN; AKAL; ÖZER, 2019). Os lácteos provaram ser uma matriz capaz de fornecer excelente crescimento e sobrevivência de diferentes cepas probióticas (NGUYEN et al., 2019).

No entanto, vem sendo observado o crescimento do número de pessoas veganas e também, uma maior detecção de intolerâncias e alergias ao leite. O estilo de vida emergente das pessoas que reduzem ou eliminam o consumo de produtos de origem animal justifica-se por questões éticas, ambientais, de saúde, filosóficas e espirituais e são práticas individuais, mas que proporcionam benefícios para toda a população do planeta. Esse movimento vem se tornando cada vez mais aceito e praticado em vários países como por exemplo, Brasil e Estados Unidos. Ademais, a alergia ao leite consiste em uma resposta imunológica anormal à proteína do leite que pode evoluir para anafilaxia. Já a intolerância a lactose é a incapacidade total ou parcial de produzir a enzima lactase. Essa incapacidade pode ter causas congênitas, fisiológicas ou adquiridas. A incidência de intolerância a lactose varia de acordo com a etnia e tem as maiores taxas no leste asiático, onde aproximadamente 80% da população é acometida.

(GHEIHMAN, 2021; PIMENTEL et al., 2021; PORZI et al., 2021; VIJAYA; VIJAYENDRA; REDDY, 2015).

Desta forma, o mercado de probióticos em matrizes vegetais, como bebidas de cereais, grãos, chás e sucos de fruta, está em ascensão. Estudos têm demonstrado a viabilidade desses microrganismos durante o armazenamento em sucos de laranja, cacau e cereja por exemplo (SANTOS FILHO et al., 2019; VIEIRA et al., 2019; MANTZOURANI et al., 2018). Além disso, pesquisas já observaram a sobrevivência dessas células quando expostas a condições gastrointestinais simuladas *in vitro* tendo como matriz o suco de laranja e o de cajá (SOARES et al., 2019; RIBEIRO et al., 2020).

Assim, além de atender à necessidade do mercado em ascensão (veganos, intolerantes e alérgicos a lácteos), o suco de fruta é rico em fibras as quais possuem efeito prebiótico, estimulando o crescimento das bactérias benéficas. Desta forma, a fruta pode exercer efeito protetor a esses microrganismos, além de possuir vitaminas e compostos fenólicos como ácidos fenólicos, flavonoides, betacaroteno que proporcionam atividade antioxidante. Ademais, o metabolismo dos probióticos nessas matrizes pode aumentar a bioacessibilidade dos compostos fenólicos potencializando a funcionalidade da bebida (PIMENTEL et al., 2021). Por outro lado, o pH do fruto e a ação antimicrobiana de alguns compostos antioxidantes, representam um grande desafio para fornecer um meio adequado para o crescimento e sobrevivência de microrganismos probióticos (SHAH, 2001; SHORI, 2016)

As frutas do cerrado são ricas em compostos fenólicos. Um exemplo é o araticum, fruta exótica típica do cerrado brasileiro. É muito apreciada pela população local, e está entre as 20 espécies mais utilizadas na alimentação regional, consumida *in natura* ou processadas (sorvete, geleias, compotas e sumo). Apresenta uma grande diversidade de compostos fitoquímicos, como carotenoides, tocoferol e algumas vitaminas, minerais e oligossacarídeos. Araticum foi o assunto de estudos envolvendo caracterização química e identificação de propriedades farmacológicas de extratos obtidos de diferentes partes da fruta. Apesar do grande potencial funcional do araticum, são poucos os estudos que avaliam seu potencial no desenvolvimento de novos produtos. O desenvolvimento do suco de araticum suplementado com probiótico pode ser considerado uma estratégia interessante para agregar maior funcionalidade ao produto (ALMEIDA et al., 1987; ARRUDA; PEREIRA; PASTORE, 2017; ARRUDA

et al., 2018; DE MORAIS et al., 2013; MACHADO et al., 2015; PIMENTA et al., 2014; VILAR et al., 2008).

O *Lactobacillus paracasei* subsp *paracasei* LBC-81 é uma cultura disponível no mercado que já foi estudada em diversas matrizes alimentares durante o período de armazenamento. Tais matrizes são: leite fermentado enriquecido com biomassa de banana verde (VOGADO et al., 2018), queijo cottage suplementado com farinha de aveia, banana verde ou grão de bico (DE MEDEIROS et al., 2021), bebida vegetal de grão de bico e coco (MESQUITA et al., 2020) e suco de maracujá (FONSECA et al., 2021). No entanto, o comportamento fisiológico de *L. paracasei* subsp *paracasei* LBC-81 no suco de araticum ainda é desconhecido.

2. OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

O objetivo deste estudo foi desenvolver um suco de araticum não fermentado suplementado com a estirpe probiótica *L. paracasei* LBC 81 e avaliar a viabilidade durante o armazenamento e após exposição às condições gastrointestinais simuladas.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Desenvolver sucos probióticos de araticum com diferentes percentuais de polpa;
- Analisar o comportamento dos diferentes percentuais de polpa durante o período de armazenamento;
- Caracterizar as formulações da bebida quanto aos parâmetros físico-químicos antes do armazenamento;
- Analisar a viabilidade e sobrevivência de *L. paracasei* LBC81 nas diferentes formulações durante o período de armazenamento;
- Avaliar o conteúdo de fenólicos totais antes e durante o período de armazenamento dos sucos com e sem probiótico;
- Avaliar a atividade antioxidante antes e durante o período de armazenamento dos sucos com e sem probiótico.
- Avaliar a sobrevivência e viabilidade de *L. paracasei* LBC 81 nas diferentes formulações após exposição a condições gastrointestinais simuladas *in vitro*.

3. REFERÊNCIAL TEÓRICO

3.1 Alimentos funcionais

A alimentação adequada e a prática regular de exercícios físicos são dois pontos fundamentais para a manutenção da saúde. O aumento da ingestão de frutas e vegetais e a redução de alimentos com alto teor de energia são, dentre outros fatores, aspectos importantes no tratamento de doenças como a obesidade (METE et al., 2019). Os nutrientes e componentes dos alimentos são estudados atualmente como capazes de modificar a expressão gênica e as funções metabólicas, podendo afetar o nível de inflamação do corpo e o risco para o desenvolvimento de diabetes tipo 2, doenças cardiovasculares e câncer (QUINTANILHA et al., 2017). Com o aumento de tais Doenças Crônicas Não Transmissíveis (DCNT), as quais são associadas à alimentação pela Organização Mundial da Saúde (OMS), a população mundial tem buscado nos alimentos funcionais componentes benéficos à saúde que vão além dos nutrientes necessários e da saciedade (DOMÍNGUEZ DÍAZ; FERNÁNDEZ-RUIZ; CÁMARA, 2020).

O termo “alimentos funcionais” foi usado pela primeira vez no Japão em 1984 (DOMÍNGUEZ DÍAZ; FERNÁNDEZ-RUIZ; CÁMARA, 2020). A sua definição é frequentemente incompreendida porque são regulamentados, mas não são legalmente reconhecidos na maioria dos países, resultando em nenhuma definição estatutária (YE; GEORGES; SELOMULYA, 2018). No Canadá, os alimentos funcionais são definidos como produtos que se assemelham a uma comida tradicional, mas que apresentam benefícios fisiológicos ao indivíduo (SHAHIDI, 2009). Na Coreia do Sul, os alimentos funcionais são definidos como suplementos dietéticos cuja função é complementar a dieta normal, e devem ser comercializados em doses, como pílulas, comprimidos, etc (KIM et al., 2007). Já a Organização para Alimentos e Agricultura das Nações Unidas (FAO, 2007) estabelece que o alimento funcional deve ser um alimento semelhante em aparência a um alimento convencional (bebida, matriz alimentar), consumido como parte de uma dieta normal, que contém componentes biologicamente ativos que demonstrem benefícios fisiológicos e que ofereçam potencial de reduzir o risco de DCNT, além da função da nutrição básica.

Os alimentos modificados e não modificados são incluídos dentro da categoria dos alimentos funcionais. Alimentos não modificados, como frutas e vegetais,

representam a mais simples forma de um alimento funcional. Alimentos como brócolis, cenoura ou tomates são considerados alimentos funcionais porque são ricos em componentes fisiologicamente ativos, como sulforafano, beta-caroteno e licopeno, respectivamente. Além dos alimentos não modificados, alimentos com adição de substâncias biologicamente ativas, tais como, fitoquímicos ou outros antioxidantes e probióticos também são consideradas alimentos funcionais (GUL; SINGH; JABEEN, 2016).

Para um alimento ser considerado funcional é necessária a realização de estudo de validação em ensaios de intervenção para cumprir os regulamentos em cada país. No Brasil, a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), através da Resolução nº 18, de 30 de abril de 1999 que aprovou o Regulamento Técnico que estabelece as diretrizes básicas para análise e comprovação de propriedades funcionais e ou de saúde alegadas em rotulagem de alimentos, define a alegação de propriedade funcional como “aquela relativa ao papel metabólico ou fisiológico que o nutriente ou não-nutriente tem no crescimento, desenvolvimento, manutenção e outras funções normais do organismo humano”. Ademais, afirma que o alimento ou ingrediente funcional deve possuir comprovação científica sobre seus benefícios à saúde e deve ser seguro para consumo sem supervisão médica.

Ademais, a RDC Nº 241, de 26 de julho de 2018 da ANVISA , que dispõe sobre os requisitos para comprovação da segurança e dos benefícios à saúde dos probióticos para uso em alimentos, estabelece critérios que incluem a identificação da linhagem do microrganismo, a comprovação da segurança por documentos técnicos ou estudos científicos que atestem a ausência de registros de efeitos adversos, de fatores de virulência, patogenicidade toxicidade ou produção de metabólitos nocivos à saúde humana além de susceptibilidade a, pelo menos, dois tipos de antibióticos, dentre outros critérios de segurança. Quando aos benefícios dos probióticos, a resolução determina a identificação clara do conjunto de evidências sobre os benefícios da linhagem. Caso ainda não possua, a agência solicita estudos e informações adicionais. Vale ressaltar a necessidade da comprovação da sobrevivência do microrganismo às condições gastrointestinais do corpo humano exigida pelo documento (AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA, 2018).

Em outra resolução da ANVISA (2017), para a alegação de eficácia do benefício do probiótico, a ANVISA estabelece o seguinte caminho: um estudo clínico para alegação geral e dois estudos para alegação específica. Estudo o qual deve ser

randomizado, duplo cego e placebo controlado. Em seguida, a linhagem passa por avaliação de autoridades reguladoras, são levantadas evidências sobre o efeito benéfico da espécie e é levado em consideração a opinião de organizações científicas independentes. Por fim, o microrganismo é estudado *in vitro* e *in vivo*. As recomendações em relação a forma de realização desses estudos foram detalhadas, posteriormente, pelo Guia para Instrução Processual de Petição de Avaliação de Probióticos para Uso em Alimentos em 2021 (ANVISA, 2021).

3.2 Bactérias lácticas e probióticos

3.2.1 Bactérias lácticas

As Bactérias do Ácido Lático (BAL) são amplamente estudadas no campo da saúde e alimentação. As BAL's são caracterizadas como Gram-positivas, catalase negativa, não esporulantes, fastidiosas, microaerofílicas e podendo apresentar morfologia coco ou bastonete. Apresentam metabolismo fermentativo, podendo ser classificadas em três grupos de acordo com o tipo de fermentação: homoláticas obrigatórias, as quais obtêm como único produto da fermentação o ácido láctico; heteroláticas obrigatórias, que produzem ácido láctico, etanol e/ou acetato e CO₂ e as heteroláticas facultativas. Algumas BAL's apresentam ainda vias de degradação de amido, proteólise e lipólise. Devido ao seu metabolismo, as BALs são amplamente utilizadas e estudadas pelo setor agrícola, alimentar e clínico. Como por exemplo, servindo de culturas iniciadoras e para a fermentação de alimentos conferindo características sensoriais. E, pelo setor clínico por proporcionarem potencial melhora do sistema imunológico e intestinal humano (AYIVI et al., 2020; RAMAN et al., 2022; MORADI; MOLAEI; GUIMARÃES, 2021).

O gênero *Lactobacillus* é o maior dentro do grupo das BALs e engloba um grande número de espécies, que são relativamente diversificadas. Estão presentes no trato gastrointestinal e urogenital de humanos e animais, em frutas e vegetais e, são utilizadas como culturas iniciadoras na fabricação de queijos e iogurtes. E nesses lácteos, são um dos responsáveis pelo sabor característico devido ao processo de fermentação por meio das conversões bioquímicas da glicólise (carboidratos em ácido láctico e outros metabólitos), proteólise (caseína em peptídeos e aminoácidos livres) e

lipólise (gordura do leite em ácidos graxos livres) (BINTSIS, 2018; CHEN et al., 2017; HILL et al., 2018).

Recentemente, a taxonomia das bactérias pertencentes ao grupo das BAL's passou por uma reclassificação taxonômica dentro do gênero *Lactobacillus*. De modo filogenético, somente bactérias da ordem *Lactobacillales* são denominadas BALs (SAUER et al., 2017). Em estudo posterior, Zheng e colaboradores (2020) propuseram a reclassificação do gênero *Lactobacillus* em 25 novos gêneros. Os novos gêneros são *Lactobacillus*, *Paralactobacillus* e os 23 novos gêneros. Os vinte e três (23) novos gêneros incluem: *Amylolactobacillus*, *Acetilactobacillus*, *Agrilactobacillus*, *Apilactobacillus*, *Bombilactobacillus*, *Companilactobacillus*, *Dellaglioia*, *Fructilactobacillus*, *Furfurilactobacillus*, *Holzapfelia*, *Lacticaseibacillus*, *Lactiplantibacillus*, *Lapidilactobacillus*, *Latilactobacillus*, *Lentilactobacillus*, *Levilactobacillus*, *Ligilactobacillus*, *Limosilactobacillus*, *Liquorilactobacillus*, *Loigolactobacillus*, *Paucilactobacillus*, *Schleiferilactobacillus*, e *Secundilactobacillus*. Essa reclassificação se deu devido ao gênero *Lactobacillus* compreender 261 espécies que eram extremamente diversas nos níveis fenotípico, ecológico e genotípico e utilizou para a nova taxonomia a sequência do genoma completo. Ainda, dentro dos gêneros *Lactobacillus* e *Bifidobacterium* várias estirpes são caracterizadas como microrganismos probióticos (MAURYA et al., 2021).

3.2.2 Bactérias lácticas probióticas

Os probióticos são definidos como microrganismos vivos que, quando administrados em quantidades adequadas, conferem benefício à saúde do hospedeiro. (FAO/OMS, 2002). O uso desses microrganismos vivos para fins de saúde é observado desde a antiguidade, através do uso de leite fermentado em casos de distúrbios do estômago e intestino. Em 1908, o bacteriologista russo, Eli Metchnikoff apresentou a primeira explicação científica dos benefícios atribuídos às BAL's presentes no leite fermentado, justificando a boa saúde e longevidade dos búlgaros ao consumo frequente de tal produto (AYIVI et al., 2020).

Atualmente, as alegações de benefícios atribuídas aos probióticos incluem a contribuição para a saúde do trato gastrointestinal, a redução do risco de dermatite atópica na infância, a redução de cólicas em bebês, a atenuação da sensação de ansiedade e a redução de desconfortos gastrointestinais relacionados ao estresse (BRASIL; ANVISA, 2020).

O mecanismo de ação dos probióticos varia entre as cepas, dose consumida e via de administração, mas os três modos de ação mais comuns são a modulação do sistema imunológico inato e adquirido do hospedeiro; o impacto dos probióticos sobre microrganismos patogênicos e a interferência sobre as toxinas de outras bactérias e sobre os produtos produzidos pelo hospedeiro. Exemplificando através dos estudos mais atuais, os probióticos competem contra bactérias patogênicas no momento de ligação às células intestinais, produzem mucinas que protegem a integridade da barreira intestinal além de outras substâncias, como as defensinas, que aumentam a efetividade da filtração dessa barreira. E em relação à imunidade, inibem o crescimento de bactérias patogênicas pela produção de peptídeos antimicrobianos, como bacteriocinas e reuterina; estimulam a produção de imunoglobulinas A (IgA), aumentam a atividade das células natural killer, produzem peróxido de hidrogênio que suprime patógenos e em contrapartida, reduzem a produção de citocinas pró-inflamatórias (AYIVI et al., 2020).

A FAO e a OMS criaram em 1963 o Codex Alimentarius. A criação do Codex Alimentarius foi importante para estabelecer regras relacionadas à segurança alimentar através de boas práticas de fabricação pela indústria de alimentos. Diante disso foi possível harmonizar as normas alimentares entre os países e permitir o comércio internacional, e, conseqüentemente, garantir maior proteção à saúde dos consumidores. Sobre o tema probióticos em alimentos e suplementos, esse documento busca estabelecer metodologias para avaliação de segurança e eficácia e critérios para fundamentar a alegação de saúde. Ainda, estabelece como requisitos mínimos para ser considerado um alimento probiótico: possuir a quantidade de células vivas de 10^9 Unidades Formadoras de Colônias (UFC) na porção recomendada para consumo diário (a menos que estudos comprovem a efetividade da cepa em quantidades menores); as bactérias devem apresentar-se viáveis durante toda a vida útil do produto e no momento do consumo, além de oferecer benefícios à saúde. Além disso, deve comprovar que a cepa mantém suas propriedades *in vitro* e *in vivo* e, além disso, é necessário pelo menos um estudo clínico em humanos (FAO/WHO - WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2018).

A fim de estabelecer os requisitos para a comprovação da segurança e dos benefícios à saúde dos probióticos para uso em alimentos, o Ministério da Saúde publicou a RDC nº 241 em 26 de julho de 2018. Essa resolução estabelece os procedimentos científicos e burocráticos para a comprovação de segurança e benefícios. Além disso, exige a caracterização e identificação inequívoca da linhagem do micro-

organismo por meio de documentos técnicos e estudos científicos. Também estabelece que os benefícios à saúde precisem estar claramente identificados e deve refletir o conjunto de evidências apresentadas dentre outras determinações (ANVISA, 2018).

Assim, inicialmente, as linhagens incluídas na lista das que atendiam aos critérios para uso como suplementos eram *Bacillus coagulans* GBI-30, *Bifidobacterium lactis* HN019, *Bifidobacterium lactis* BL-04, *Lactobacillus acidophilus* LA-14, *Lactobacillus acidophilus* NCFM, *Lactobacillus casei* LC-11, *Lactobacillus paracasei* LPC-37 e *Lactobacillus reuteri* DSM 17938 em quantidades mínimas recomendadas que variam entre 1×10^8 e 1×10^9 UFC/dia (ANVISA 2017).

Posteriormente, em 2020, a lista foi atualizada e foram adicionadas as linhagens *Bifidobacterium animalis subsp. lactis* BB12 (DSM 15954), *Bifidobacterium animalis subsp. lactis* HN019 (ATCC SD5674), *Lactobacillus acidophilus* NCFM (ATCC SD5221), *Lactobacillus gasseri* BNR17 (KCTC 10902BP), *Lactobacillus rhamnosus* HN001 (ATCC SD5675), *Lactobacillus rhamnosus* GG (ATCC 53103), *Lactobacillus rhamnosus* GG (DSM 33156), *Limosilactobacillus reuteri* DSM 17938, associação de *Lactobacillus rhamnosus* R0011 (CNCM I-1720) e de *Lactobacillus helveticus* R0052 (CNCM I-1722), *Bifidobacterium lactis* NCC 2818 e a dosagem mínima necessária varia entre 1×10^8 e $1,7 \times 10^{10}$ UFC/dia (BRASIL; ANVISA, 2020).

Atualmente, o consumo dos probióticos é observado em 63 países em um mercado avaliado em 2,15 bilhões de dólares no ano de 2021. O consumo global mais frequente é através de iogurte (73%), seguido de leites fermentados (15%) e suplementos (12%) (FAO/WHO - WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2018). Segundo Pimentel (2021), os consumidores veganos e intolerantes ou alérgicos ao leite representam um público promissor para o mercado de produtos com células vivas que utilizem extratos solúveis em água à base de vegetais. Vale ressaltar que para o público vegano, é importante o conhecimento sobre a origem da cepa para que não seja proveniente de produtos animais a fim de manter as características veganas do produto (PIMENTEL, 2021).

3.2.3 *Lactobacillus paracasei* subsp *paracasei* LBC 81

Pelo vasto estudo do gênero *Lactobacillus*, onde se encontra várias estirpes probióticas, foi reconhecido como Geralmente Reconhecida como Seguras (GRAS) pela

FDA e ingressou na lista de Presunção Qualificada de Segurança (QPS) da Autoridade Europeia para a Segurança dos Alimentos. Dentro desse gênero, existe o grupo *Lactobacillus casei*, composto principalmente pelas espécies *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus paracasei* e *Lactobacillus rhamnosus* que são heterofermentativas facultativas e, por produzirem metabólitos bioativos nesse processo, podem proporcionar benefícios a saúde do hospedeiro. Estuda-se a possível utilização dessas cepas para a manutenção da microbiota intestinal saudável e com isso ser aplicada como profilaxia ou terapia adjuvante não invasiva em alergias, obesidade, câncer, diarreia e como “psicobióticos” na depressão e ansiedade (HILL et al., 2018).

As células de *Lactobacillus paracasei* são bastonetes (0,8-1,0 × 2,0-4,0 µm), com maior frequência, apresentam extremidades quadradas, são observados isolados ou em cadeias. Seu crescimento acontece em temperaturas entre 10 e 40°C, mas algumas cepas crescem entre 5 e 45°C. Essa espécie tem atividade nômade e já foram isoladas na cavidade oral humana, em laticínios e hospedeiros invertebrados (ZHENG et al., 2020).

O *Lactobacillus paracasei* subsp *paracasei* LBC 81, também chamada de *Lactobacillus paracasei* LPC-37, é uma cultura probiótica disponível para comercialização que já foi utilizada no desenvolvimento de vários produtos, como leite fermentado, bebidas vegetais, leite fermentado adicionado de farinha de banana verde (DE MEDEIROS et al., 2020; MESQUITA et al., 2020; VOGADO et al., 2018). Sua cultura estoque está armazenada na American Type Culture Collection ATCC, nomeada como SD5275 e foi, inicialmente, isolada de fonte láctea. (BARKER et al., 2017) (GOH; BARRANGOU, 2021).

O *Lactobacillus paracasei* Lpc-37, em estudo randomizado, duplo-cego, controlado por placebo e paralelo, foi associado a redução da percepção de estresse quando administrado durante cinco semanas. Tal resultado se deve ao fato da interação do hospedeiro e microrganismo influenciar a liberação de moléculas de sinalização imunológica e neurológica por meio de vias bidirecionais entre microbiota-intestino-cérebro através do sistema nervoso central, entérico e autônomo e pelo eixo hipotalâmico-pituitário-adrenal provocando um efeito final de regulação da neuroinflamação, do neurodesenvolvimento e da resposta neuroendócrina ao estresse (PATTERSON et al., 2020).

Uma sobremesa cremosa de chocolate ao leite se mostrou uma matriz adequada para *L. paracasei* LBC 81 mantendo a contagem de células vivas acima do nível recomendado durante 28 dias (VALENCIA et al., 2016). Essa estirpe também manteve-

se estável em queijo tipo cottage suplementado com farinha de banana verde e aveia ou grão de bico sob refrigeração (DE MEDEIROS et al., 2020). Ademais, o *L. paracasei* Lpc-37 sobreviveu em café desde que suplementado com glicose e consumido frio (abaixo de 45°C) (CHAN; TOH; LIU, 2020).

3.3 Sobrevivência de bactérias lácticas probióticas em bebidas elaboradas com suco de frutas

As frutas são ricas em carboidratos, ácidos, minerais, polifenóis, vitaminas, aminoácidos, compostos aromáticos, carotenoides, fibras, fitoesteróis e água. Devido à ampla presença de compostos bioativos, podem prevenir patologias e são boas fontes para a extração de compostos bioativos e produção de nutracêuticos e alimentos funcionais. A Organização Mundial da Saúde (OMS) recomenda o consumo de pelo menos 400 g ou cinco porções de frutas e vegetais por dia, associando a um menor risco para o desenvolvimento de DCNT's (RODRÍGUEZ et al., 2021).

Ademais, a sobrevivência das culturas de microrganismos depende das etapas de processamento, da matriz alimentar, do tipo de cepa probiótica, forma de incorporação na matriz, condições de armazenamento e adição de componentes prebióticos. E assim, as frutas possuem altos níveis de carboidratos e atividade de água e tais condições são consideradas ótimas para o crescimento microbiano. Entretanto, seus baixos valores de pH (2,0-4,5) as tornam suscetíveis a deterioração por fungos e leveduras. E, a acidez dos sucos pode ser um obstáculo para a sobrevivência dos probióticos (KUMAR; VIJAYENDRA; REDDY, 2015). Devido ao alto nível de carboidratos, várias categorias de frutas vêm sendo utilizadas na elaboração de bebidas fermentadas por BAL's, bem como veículos para probióticos (RODRÍGUEZ et al., 2021; PIMENTEL et al., 2021).

Esses novos produtos probióticos à base de suco de fruta vêm atendendo uma demanda crescente de indivíduos que não consomem alimentos de origem animal e o público intolerante ou alérgico ao leite, visto que até hoje, a maioria dos produtos probióticos possuem os lácteos como matriz (JAYARATHNA et al., 2021). No Brasil em 2020, 30 milhões de pessoas não consumiam proteína animal representando 14% da população. Ainda, 55% da população apresenta o desejo de comer mais produtos de origem vegetal e justificam suas escolhas por razões de saúde, sustentabilidade, dietéticas e por questões sociais e políticas (PIMENTEL et al., 2021).

O Decreto nº6.871, de 4 de junho de 2009 da Presidência da República, define “bebida” como “o produto de origem vegetal industrializado, destinado a ingestão humana em estado líquido, sem finalidade medicamentosa ou terapêutica” e complementa considerando também bebida:

A polpa de fruta, o xarope sem finalidade medicamentosa ou terapêutica, os preparados sólidos e líquidos para bebidas, a soda e os fermentados alcoólicos de origem animal, os destilados alcoólicos de origem animal e as bebidas elaboradas com a mistura de substâncias de origem vegetal e animal.

E ainda, define suco como:

Bebida não fermentada, não concentrada e não diluída, destinada ao consumo, obtida da fruta madura e sã, ou parte do vegetal de origem, por processamento tecnológico adequado, submetida a tratamento que assegure a sua apresentação e conservação até o momento do consumo.

A tecnologia de alimentos é capaz de desenvolver produtos que forneçam probióticos em alimentos. Esses microrganismos podem se tornar mais resistentes à passagem pelo trato gastrointestinal quando são ingeridos em matriz alimentar, junto com prébióticos, se comparados a fármacos. Esses alimentos podem ser fermentados pelas bactérias ou suplementados com culturas bacterianas. Contudo, as matrizes alimentares precisam apresentar condições intrínsecas ideais para assegurar a estabilidade das culturas probióticas no decorrer do período de armazenamento (NEFFE-SKOCIŃSKA et al., 2018).

A estirpe *Lactobacillus casei* NRRL B-442 demonstrou boa capacidade fermentativa quando inoculada em suco de cacau em condições iniciais de pH 6,2 e, incubação a 33 °C por 12 horas de fermentação (SANTOS FILHO et al., 2019). Já a estirpe de *Lactobacillus rhamnosus* GG quando submetida a microencapsulação em alginato de sódio associado à goma arábica, apresentou maior estabilidade em suco de cacau quando incubado a 4°C por 28 dias (EZEKIEL; OJUOLA; ADEDEJI, 2020).

Em suco de laranja com pH ajustado para 4,5 a viabilidade de *Pediococcus acidilactici* CE51 é acentuada quando armazenado a 30 °C durante 35 dias (VIEIRA et al., 2020). Miranda et al. (2019) verificaram que a estirpe *L. casei*-01 liofilizada Chistian Hansen®, 9 Valinhos, Brasil, também manteve a viabilidade em suco de laranja durante 28 dias de armazenamento a 7°C. Além disso, observaram que a adição da cultura na forma liofilizada em relação ao concentrado de células frescas é uma

metodologia mais adequada a ser utilizada quando o objeto é obter uma bebida probiótica não fermentada. Tal conclusão foi baseada na menor interferência nas características físico-químicas e sensoriais.

Bifidobacterium lactis Bb12, *Lactobacillus plantarum* 299V e *Lactobacillus acidophilus* La5 foram utilizadas como culturas iniciadoras na fermentação de suco de abacaxi. Após 24 horas de fermentação todas as estirpes atingiram uma população de 10^9 UFC, com maior desenvolvimento da estirpe *L. plantarum* 299V. No decorrer do período de 30 dias de armazenamento a 4°C, as estirpes mantiveram a viabilidade (NGUYEN et al., 2019). A viabilidade das bactérias lácticas *Pediococcus pentosaceus* LaG1, *Lactobacillus rhamnosus* GG, *Pediococcus pentosaceus* também foi avaliada no suco de abacaxi fermentado e como resultado, obteve-se $1,05-1,10 \times 10^9$ UFC / mL, níveis considerados adequados pelo estudo, durante todo o período de armazenamento (4 semanas a 4°C) (TAYO; AKPEJI, 2016).

Mantzourani et al. (2018) avaliaram o crescimento da estirpe *L. plantarum* ATCC 14917 em suco de cereja da Cornualha fermentado por 24 horas, e em seguida avaliaram a viabilidade durante o armazenado a 4°C por 4 semanas. Os autores observaram que apesar da redução da viabilidade de *L. plantarum* ATCC14917, os valores de viabilidade (entre 10^6 e 10^7 UFC/mL) alcançados ficaram em níveis considerados adequados para um produto ser considerado funcional (MANTZOURANI et al., 2018).

Em suco de romã fermentado por *Lactobacillus plantarum* ATCC 14917 a viabilidade foi mantida acima de 8,8 log UFC/mL durante um período de armazenamento de 4 semanas a 4°C, e apresentando uma população bacteriana maior na 4ª semana (MANTZOURANI et al., 2019).

Em suco de tâmara fermentado pelas bactérias *L. acidophilus* La5 e *L. sakei* NRRL 1917 (início do armazenamento continha 7×10^6 e $2,2 \times 10^8$ CFU / mL respectivamente) identificou concentrações de 10^4 UFC / mL de *L. acidophilus* após 3 semanas de armazenamento, valores abaixo do recomendado (10^6 UFC/mL considerado adequado pelo estudo). A diminuição da viabilidade foi atribuída a redução de pH, de 4,22 para 3,43 do suco, o que causou o aumento da sensibilidade das células às condições ácidas. Contudo, os *L. sakei* sobreviveram, em quantidades adequadas ($1,8 \times 10^7$ UFC / mL), até a terceira semana sob refrigeração a 4°C, mesmo com a redução do pH (MOSTAFA; ALI; MOHAMED, 2021).

3.4 Efeito da matriz alimentar na sobrevivência de probióticos em condições gastrointestinais *in vitro*.

Os efeitos benéficos à saúde dos probióticos estão relacionados a sua atividade no intestino, tais como colonização e sobrevivência. Por isso, grande parte deles precisa permanecer viva, resistindo aos efeitos fisiológicos e processos físico-químicos do sistema gastrointestinal. O percurso desses microrganismos vivos potencialmente benéficos inicia na boca, passando pelo esôfago, estômago e termina no intestino, onde poderá exercer suas funções. Os três pontos que representam os maiores desafios à viabilidade são o suco gástrico (ácido clorídrico), suco intestinal e sais biliares. E assim, transitam por meios ácidos (estômago) e básicos (duodeno) (VERRUCK,; PRUDENCIO, 2019).

Desta forma, na boca, as glândulas salivares secretam saliva e a digestão do carboidrato se inicia, assim a matriz alimentar e as bactérias podem ficar mais expostas ao oxigênio e a atividade de água, sendo tais condições não consideradas favoráveis a manutenção da viabilidade. A saliva também apresenta a lisozima, a qual exerce atividade antibacteriana. O pH da boca é de 7 e o alimento permanece nesse local por aproximadamente 1 a 2 minutos. Contudo, os microrganismos tendem a apresentar resistência a essa etapa (NEFFE-SKOCIŃSKA et al., 2018).

Já, no estômago encontram-se importantes barreiras à viabilidade dos probióticos devido ao seu baixo pH e ação antimicrobiana da pepsina. Esse órgão geralmente produz 2,5 litros de suco gástrico por dia, além de pepsina e lipase gástrica, possuindo pH entre 2,5 e 3,5 podendo variar de acordo com o alimento ingerido. O tempo de permanência no estômago também varia de acordo com a consistência. Alimentos sólidos ficam em torno de 2 a 4 horas e os líquidos permanecem por tempo inferior (HILL et al, 2018; MESQUITA et al., 2021; NEFFE-SKOCIŃSKA et al., 2018).

Outros obstáculos são os sais biliares, que tem efeito bactericida e tornam a membrana celular bacteriana mais permeável, e o suco intestinal (contendo diversas enzimas, dentre elas amilase e lipase pancreática, maltase, tripsina e elastase). Esses dois últimos são liberados no intestino delgado, mais especificamente no íleo e no duodeno. Por dia, são produzidos aproximadamente 7 litros de suco intestinal (contendo enzimas como lactase, amilase). O alimento permanece nesse órgão por 1 a 4 horas a

um pH de aproximadamente 8,0. Por fim, os probióticos tendem a se instalar no cólon, onde ainda competem com um grande número de bactérias residentes nesse local (HILL et al, 2018; MESQUITA et al., 2021; NEFFE-SKOCIŃSKA et al., 2018).

Entretanto, estudos quais? têm demonstrado mecanismos de defesas das BAL's às condições do trato gastrointestinal. Para se manterem resistentes à passagem pelo suco gástrico, algumas bactérias contam com processos que incluem a neutralização, no qual as bactérias produzem substâncias alcalinas como ureia em um processo que conta com a enzima urease que hidrolisa ureia em amônia e dióxido de carbono; arginina, que pela enzima arginina dihidrolase catalisa a conversão de arginina em ornitina, amônia e dióxido de carbono; e aspartato que aumenta o fluxo de metabólitos para a biossíntese de arginina (WANG; CUI; QU, 2018). Também, utilizam o mecanismo da bomba de prótons para a homeostase de pH, o qual conta com múltiplos sistemas de transportes baseados em bombas eletrogênicas que expõem prótons das células, gerando um potencial de membrana e um gradiente de pH, sendo regulado pela transferência de cátions e prótons (GUAN; LIU, 2020).

Ainda em resposta ao ácido, muitos microrganismos realizam a proteção de macromoléculas na qual as bactérias sintetizam proteínas, na presença de ácidos, para defender ou reparar macromoléculas como o DNA e proteínas da própria célula microbiana (GUAN; LIU, 2020). Ademais, de forma ainda controversa, estudos atribuem à atividade da proteína hidrolase de sais biliares, expressa por algumas dessas bactérias, uma maior resistência quando em contato com os sais biliares por serem capazes de metabolizá-los e inativar sua atividade detergente e assim, não prejudicando a membrana plasmática das bactérias (HILL et al, 2018). Além disso, a resistência do probiótico ao trato gastrointestinal pode estar relacionada ao tipo de bactéria e à matriz alimentar (VAN DE GUCHTE et al., 2002; PIMENTEL et al., 2021).

Desta forma, para identificar se o probiótico chega ao intestino viável para desempenhar suas funções, os estudos simulam, *in vitro*, as condições gastrointestinais. Por exemplo, a pesquisa de Soares e colaboradores (2019) avaliou a viabilidade de diferentes estirpes de *Bifidobacterium*, *Lactobacillus* e *Bacillus* em matrizes alimentares distintas, sendo elas requeijão cremoso, suco de laranja pasteurizado e pão, simulando um sistema gastrointestinal com pH 2 (semelhante ao estômago), pH 5 (semelhante a fase entérica 1) e pH 7 (semelhante a fase entérica II). Como resultado, observaram proteção adequada nas três matrizes, confirmando a possibilidade de utilização de outros alimentos não lácteos.

Um concentrado de células de *Pediococcus acidilactici* CE51 inoculadas em suco de laranja resistiram a um pH de 2,0, 2,5 e 3,5 por até 180 minutos sem redução da população inicial. Além disso, mantiveram-se estáveis na presença de sais biliares a 0,3%, 0,6% e 0,9% durante o mesmo período de tempo, sendo que a 0,9% de sais biliares apresentou maior sensibilidade (VIEIRA et al., 2020)

O suco de cajá (pH inicial de 6,4 e armazenamento a 4°C por 28 dias) adicionado de *Lactobacillus acidophilus* NRRL B-4495 foi exposto a condições gastrointestinais simuladas *in vitro*. Inicialmente foi submetida a solução de NaCl contendo pepsina, seguida de um ajuste de pH para 2 com HCl, simulando as condições gástricas. E posteriormente, exposta a condições intestinais simuladas através da adição de pancreatina e sais biliares, e pH ajustado para 8 em solução de NaOH. As amostras foram analisadas antes e após o período de armazenamento e o suco de cajá se mostrou uma matriz protetora eficiente para a sobrevivência das bactérias (RIBEIRO et al., 2020).

Em discordância, o suco de abacaxi foi utilizado como matriz carreadora para *Lactobacillus acidophilus* La5, *Lactobacillus plantarum* 299V e *Bifidobacterium lactis* Bb12, e foram expostas às condições simuladas gastrintestinais expondo as células por 135 minutos ao fluido gástrico (pH 2,0) contendo pepsina, seguido por 2,5 hora de incubação em solução tamponada de KH_2PO_4 (pH 7,43) na presença de 0,6 % de sais biliares. Após esses tratamentos no suco de abacaxi fermentado e armazenado por um mês, houve redução de 0,11 log UFC / ml da viabilidade após tratamento com a pepsina e mais 0,1 log UFC / ml após tratamento com 0,6% de sais biliares (NGUYEN et al., 2019).

De forma semelhante, o suco de uva não se mostrou uma matriz protetora eficiente para *Bifidobacterium bifidum* ATTC-4356 tanto na forma livre, quanto encapsuladas em condições gastrointestinais simuladas, apresentando redução significativa nas concentrações de células vivas (AFZAAL et al., 2020).

3.5. Fruto do cerrado: Araticum

O cerrado é o segundo maior bioma presente no Brasil, abrange aproximadamente 25% de todo o país. Por possuir uma das mais variadas floras e

faunas, foi considerada uma área de conservação prioritária. Estudo sobre frutas do Cerrado aumentam sua valorização e preservação (PRADO et al., 2020).

O araticum, também denominado popularmente de marolo, bruto ou panã, possui nome científico *Annona crassiflora*, da família *Annonaceae*, caracteriza-se como uma fruta oval ou arredondada, com peso que varia entre 0,5 e 4,5kg, de casca verde antes do amadurecimento e marrom e grossa nos estágios mais avançados de maturação. Suas sementes são pretas e lisas presas a polpa branca, viscosa e mole. A fruta desenvolve-se em árvore típica do bioma Cerrado, que cresce em áreas secas e arenosas. Tal planta, de crescimento lento, alcança seis a oito metros de altura e frutifica quando atinge dois metros de altura. A fruta é colhida quando amadurece e cai. A colheita é feita entre os meses de setembro e abril (ISPN, 2021). Por seu sabor adocicado presente na polpa e aroma intenso, possui boas características sensoriais, favorecendo a boa aceitação pelos consumidores (RAMOS et al., 2022). A *Annona crassiflora* tem sido utilizada como matéria prima para a fabricação de alimentos, cosméticos e fármacos (ARRUDA; PASTORE, 2019).

Além disso, o araticum é um produto da sociobiodiversidade. Esse conceito expressa a relação entre a diversidade biológica e sociocultural, ou seja, é a relação entre bens e serviços gerados a partir de recursos naturais através de cadeias produtivas compostas por comunidades tradicionais e agricultura familiar. De acordo com o Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, o conceito é “valorizar a diversidade biológica, social e cultural brasileira e apoiar a estruturação de arranjos produtivos e roteiros de integração em torno de produtos e atividades da sociobiodiversidade, de forma a contribuir para a geração de renda e inclusão produtiva” (BRASIL, 2019).

Ademais, a composição nutricional da fruta apresenta quantidades consideráveis de carboidratos, principalmente glicose, frutose e sacarose; fibras, com predominância das insolúveis e é rica em potássio, vitamina A e quercetina. Em menores concentrações, possui cálcio, magnésio fósforo, zinco, folato, niacina, vitamina C, licopeno e ferro. Seu pH é de 4.7 (BRASIL, 2018). Um estudo analisou o perfil de oligossacarídeos em frutos do Cerrado brasileiro e concluiu que o araticum contribui para a ingestão alimentar de oligossacarídeos prebióticos com predominância de seis tipos: 1-kestose em maior quantidade e 1F- β -frutofuranosilnistose, maltotriose, xylotriose, xilopentaose e xilohexaose (ARRUDA; PEREIRA; PASTORE, 2017b). Outro estudo sobre a determinação de compostos fenólicos do fruto observou maior

concentração na casca, seguido da polpa e das sementes. Catequinas e epicatequinas estavam mais presentes na polpa e na casca e as sementes eram ricas em ácido cafeico. A conclusão foi que a fruta é fonte de antioxidantes fenólicos naturais (ARRUDA et al., 2018b).

A composição nutricional da polpa de araticum, de acordo com a literatura, foi mostrada na tabela abaixo (Tabela 1).

Tabela 1. Composição nutricional do araticum por 100g pela literatura.

Nutrientes	Quantidade
Energia total (kcal)	110,00
Carboidrato (g)	20,43
Frutose (g)	5,48
Glicose (g)	5,15
Sacarose (g)	2,19
Proteína (g)	1,37
Lipídeos totais (g)	3,57
Fibras totais (g)	4,80
Fibras solúveis (g)	1,30
Fibras insolúveis (g)	6,20
Potássio (mg)	287,00
Vitamina A (mg)	288,00
Cálcio (mg)	13,00
Ferro (mg)	0,76
Magnésio (mg)	22,00
Fósforo (mg)	12,00
Zinco (mg)	2,15
Folato (mcg)	27,00
Niacina (mg)	2,48
Vitamina C (mg)	26,02
Ferro (mg)	0,76
Quercetina (mcg)	83,90
Licopeno (mcg)	20,00

Fonte: adaptada de Brasil (2018).

Quanto aos benefícios atribuídos ao consumo da *Annona crassiflora*, um estudo em ratos avaliando compostos fenólicos presentes na casca constatou efeito antinociceptivos, anti-inflamatório e hepatoprotetor, atribuído a supressão de citocinas pró-inflamatórias, redução da infiltração de neutrófilos e melhoria dos parâmetros oxidativos e nitrosativos (JUSTINO, 2021). Em concordância, uma revisão abrangente constatou que o araticum tem potencial antioxidante, hepatoprotetor, anti-inflamatório, antitumoral, analgésico, antidiabético, cicatrizante da pele, atidiarréico, antimicrobiana, antiparasitária, inseticida e herbicida. Tais efeitos são atribuídos aos compostos

fenólicos presentes (alcalóides, acetogeninas anonáceas, tocóis, carotenoides, fitoesteróis), além de vitaminas, fibras alimentares, minerais e óleos essenciais. Além disso, a polpa, casca, sementes e folhas são usadas desde a antiguidade pela medicina popular para cuidar de patologias (ARRUDA, PASTORE 2019).

Um estudo mais recente que utilizou as análises de determinação do teor de compostos fenólicos totais e de flavonoides, atividade antioxidante (DPPH e ABTS) e ensaio antiploriferativo, também identificou constituintes fitoquímicos significativos pertencentes às classes de ácidos fenólicos flavonóides, alcalóides aporfínicos, acetogeninas e ésteres de ácidos graxos, atribuindo ao fruto o efeito antioxidante, antiproliferativo, sendo promissor para a produção de alimentos funcionais com o propósito de contribuir com o controle do estresse oxidativo e tratamento do câncer (CARVALHO et al., 2022).

Ademais, um estudo *in vitro* identificou altas quantidades de epicatequina na casca e catequina nas sementes o que conferiu capacidade antioxidantes com efeitos antiproliferativos e cicatrizantes em células cancerosas (PRADO et al., 2020). Recentemente, Ramos e colaboradores (2022) justificaram seu estudo com o fato de o araticum se destacar pelos seus benefícios à saúde humana e por isso, sua composição química deve ser exaustiva e efetivamente analisada. Assim, através do método de espectrometria de massa de ionização por spray de papel, constataram a predominância de acetogeninas e alcalóides, em todas as partes do fruto, que são metabólitos secundários com potencial terapêutico antitumoral, antimicrobiana, antineoplásico, antiparasitário, imunossupressores e pesticida.

Corroborando com o estudo de Ramos et al (2022), Barbosa e colaboradores (2002) constataram a presença alcalóides aporfínicos que são reconhecidos por sua atividade inibitória de acetilcolinesterase, um importante alvo na terapia do Alzheimer.

4. METODOLOGIA

4.1 Tipo de estudo

Trata-se de um estudo experimental quantitativo e qualitativo que foi subdividido nas seguintes etapas: (1) elaboração da bebida adicionada de *L. paracasei* LBC 81, (2) caracterização físico-química das bebidas antes e após o armazenamento sob refrigeração, (3) análises microbiológicas durante a vida útil das bebidas, (4) análise

de fenólicos totais e potencial antioxidante das bebidas e (5) determinação da sobrevivência de *L. paracasei* sob condições simuladas gastrointestinais.

4.2. Preparo da polpa de araticum

A fruta araticum foi adquirida em feira livre de Brasília, Distrito Federal, Brasil. As frutas foram submetidas à lavagem da casca com água corrente, e posteriormente sanitizadas em solução contendo água e um composto a base de cloro (Hidrosan Plus®) por 15 minutos. Após a sanitização, as frutas foram descascadas e despulpadas, e imediatamente embaladas em sacos plásticos a vácuo. As polpas obtidas foram armazenadas em freezer a – 80°C.

4.3 Preparo e processamento do suco de araticum adicionado de concentrado de células de *L. paracasei* LBC 81

4.3.1 Preparo do suco de araticum

O suco de araticum foi preparado de acordo com as seguintes formulações abaixo:

- Formulação 1 (F1): 20 % de polpa de araticum + 80 % de água mineral;
- Formulação 2 (F2): 30 % de polpa de araticum + 70 % de água mineral;
- Formulação 3 (F3): 40 % de polpa de araticum + 60 % de água mineral.

A polpa e a água foram pesadas em balança de precisão (Labor, São Paulo, Brasil), homogeneizadas em liquidificador (Walita, São Paulo, Brasil) à velocidade 6 por 2 minutos, e em seguida foram passadas em voal para eliminação dos resíduos. Frascos contendo 150 mL de cada formulação foram submetidos à pasteurização em banho de água a 65 °C por 15 minutos. Esse binômio foi testado anteriormente na F3 (40% de polpa), para avaliar a redução da população de contaminantes de mesófilos aeróbios.

Em seguida, os frascos foram armazenados em geladeira a uma temperatura de 4°C.

4.3.2 Preparo das bebidas adicionadas do concentrado de células de *L. paracasei* LBC 81

4.3.2.1 Preparo do estoque de cultura

A cultura de *L. paracasei* subsp *paracasei* LBC 81 (DuPont™) foi utilizada neste estudo. Alíquota de 50 µL da cultura congelada foi inoculada em um frasco contendo 5 mL de caldo De Man Rogosa e Sharpe (MRS) para cultivo de *Lactobacillus* (Acumedia-Neogen Corporation, Michigan, EUA), e imediatamente a cultura foi incubada em estufa bacteriológica a 37°C por 24 horas. Para confirmação da pureza da cultura, a mesma foi estriada em placa de Petri contendo MRS ágar e, em seguida, a placa foi incubada em estufa bacteriológica 37 °C/24 h. Posteriormente, colônias selecionadas da placa de Petri, com o auxílio da alça de Niquel Cromo, foram adicionadas em 5 mL de caldo MRS, e imediatamente incubadas em estufa bacteriológica para obtenção de cultura ativa em meio líquido. A cultura ativa obtida foi inoculada (inoculo de 50 µL) em 5 mL de caldo MRS, sendo incubada a 37°C por 24 horas. A cultura crescida obtida foi submetida à centrifugação (2.655g, 5 minutos, 4°C), descartou-se o sobrenadante e o *pellet* de células obtido foi lavado com caldo MRS. Repetiu-se o mesmo procedimento de centrifugação, e o *pellet* de células foi suspenso com 150 mL de caldo MRS adicionado de 20% de glicerol. Alíquotas de 1,5 mL do concentrado de células foram distribuídas em 3 tubos criogênicos para armazenamento em freezer a -80°C. Todos os experimentos realizados partiram desta cultura estoque a -80°C.

4.3.2.2. Preparo do concentrado de células para adição nas formulações

Após a terceira etapa da ativação descrita no tópico anterior, foram retirados, do tubo contendo 5 mL de caldo MRS com a cultura, 750 µL para serem adicionados em nove frascos contendo 75 mL de caldo MRS e incubados a 37° C por 24 horas.

Posteriormente, cada frasco foi dividido em 2 tubos Falcon (cada um com 37,5mL) para centrifugação (3075 g, 4°C, por 10 minutos). Em seguida, o sobrenadante foi descartado e foram adicionados 10 mL de solução salina a 0,85%. Após homogeneizados, os tubos foram submetidos a um choque frio em isopor contendo gelo durante 15 minutos, e em seguida foram centrifugados novamente nas mesmas condições. O processo de lavagem do *pellet* foi repetido mais uma vez, sob as mesmas condições e o sobrenadante foi descartado para adição de 20mL do suco de araticum pasteurizado, homogeneizado em agitador vortex e adicionado a cada tratamento da bebida (150 mL de bebida).

Assim, cada formulação (20%, 30% e 40% de araticum) foi produzida na versão com e sem probiótico e cada tratamento realizado com 3 repetições. Também, foram aliqüotadas amostras das bebidas antes da pasteurização (NP) de acordo com a tabela abaixo:

Tabela 2. Esquema experimental dos sucos.

Tratamentos	Repetições com bactéria	Repetições sem bactéria
Não pasteurizada (NP)		1.1/1.2/1.3
	Não possui	2.1/2.2/2.3
		3.1/3.2/3.3
1: 20% de polpa	1.1	1.1
	1.2	1.2
	1.3	1.3
2: 30% de polpa	2.1	2.1
	2.2	2.2
	2.3	2.3
3: 40% de polpa	3.1	3.1
	3.2	3.2
	3.3	3.3

4.4 Análise físico-química das bebidas após pasteurização

4.4.1 Determinação da composição centesimal da polpa e da bebida de araticum

A polpa de araticum e as bebidas de araticum (sem adição de probiótico), após a pasteurização, foram analisadas quanto à composição centesimal.

4.4.1.1. Umidade

Para obter os níveis de umidade das bebidas e da polpa, foram utilizadas as Normas Analíticas do Instituto Adolfo Lutz (2008). Primeiro, reservou-se cerca de 400g de cada bebida e da polpa de araticum, que foram colocadas em recipientes de porcelana. No segundo momento, as amostras foram submetidas à estufa a 65 °C por 48 horas, para parcial evaporação da água e concentração da matriz, em seguida, foram homogeneizadas. Logo após, pesou-se 10g das amostras das bebidas e 5g da amostra de polpa para a transferência para cadinhos, que permaneceram em estufa a 105 °C por 29 horas, até obtenção de peso constante. A umidade foi expressa em porcentagem de base úmida, utilizando a seguinte equação:

$$\text{Umidade (\%)} = (m1 + m2) / mt$$

m1 = massa de água evaporada na primeira etapa (g)

m2 = massa de água evaporada na segunda etapa (g)

mt = massa da amostra (g)

4.4.1.2. Proteína

A quantificação de proteína da polpa e das bebidas foram realizadas pelo método de Kjeldahl 991.22 (AOAC, 2005). No qual, 2g de cada amostra foram colocados em tubos contendo 1g de mistura catalítica e depois, adicionado 3,5mL de ácido sulfúrico

(H₂SO₄) 4%, seguindo para o bloco digestor, onde ficou até atingir a temperatura de 450°C e permaneceu durante 4 horas.

Posteriormente, as amostras foram acrescidas de 10mL de água destilada para destilação do nitrogênio realizada com o destilador Tecnal (modelo TE – 036/1). Para cada amostra, cerca de 7,5mL de ácido bórico 4% (H₃BO₃) foram adicionados em béqueres de vidro e 4 gotas de azul de metileno 1% + vermelho de metileno 2% foram usadas como indicador. Os tubos contendo as amostras e os béqueres com solução de ácido bórico foram alocados no destilador. Hidróxido de sódio 50% (NaOH) foi adicionado no copo medidor do aparelho e, em seguida, iniciado o processo de destilação do nitrogênio. Realizou-se a titulação com ácido clorídrico 0,1 M (HCl) até as amostras atingirem o ponto de viragem (rosa/roxo). A obtenção do nitrogênio foi expressa em porcentagem pela seguinte equação:

$$\% N = V \times M \times f \times 14 \times 100 / m$$

Em que:

V = volume gasto da solução de HCl na titulação.

M = molaridade da solução de HCl.

f = fator de correção da solução de HCl.

m = massa da amostra (mg).

A quantidade de proteína presente em cada amostra foi determinada pela multiplicação do resultado para o teor de nitrogênio pelo fator de conversão de nitrogênio (% N), que é 6,25, conforme a seguinte equação: % Proteína = % N x 6,25.

4.4.1.3. Lipídio

O teor lipídico total das bebidas e da polpa de araticum foi determinado pelo método de extração Am 5-04, utilizando o extrator de lipídios (modelo ANKOM XT15 da Ankom Technology, New York, United States of America) (AOCS, 2005). Após submissão à estufa a 60°C, para parcial evaporação da água e concentração da matriz, como descrito no item “4.4.3 umidade”, pesou-se cerca de 1g de cada amostra, que foi colocada em sachês de extração de lipídios e alocadas em cartuchos apropriados do extrator. Foi utilizado éter de petróleo como solvente para a extração. Em seguida, as

amostras foram inseridas em estufa a 105°C, para evaporação do solvente, e pesadas. Os valores de lipídio foram obtidos pela diferença de massa após extração. Utilizou-se também a massa das amostras em base úmida, assim o teor de lipídio foi determinado pela seguinte equação: %Lipídio = (100 x gramas de lipídeos extraídos) / gramas de amostra em base úmida.

4.4.1.4. Resíduo Mineral (cinzas)

Essa análise foi realizada pelo método 945.45 (AOAC, 2005). Pesou-se as amostras (10g da bebida e 5g da polpa), que foram dispostas em cadinhos e submetidas à mufla em temperatura de 600°C e após, foram pesadas novamente. A determinação de resíduo mineral é obtida pela perda de massa orgânica da amostra, assim o percentual de cinzas foi obtido pela equação:

$$\% \text{ Cinzas} = 100 \times m_c / m$$

Em que:

m_c = massa de cinzas (g).

m = massa da amostra (g).

4.4.1.5. Fibras

A quantificação de fibra bruta da polpa de araticum e das bebidas foi determinada pela metodologia 978.10 da AOAC (2005) com modificações.

Para esta análise, utilizou-se as amostras que passaram pelas etapas iniciais do item 4.4.1.1, ou seja, que permaneceram na estufa a 65°C por 48 horas. Dessas amostras, foram retirados 1,5g e colocados nos sachês próprios para tal análise devidamente identificados e selados. Os sachês contendo as amostras foram colocados na estufa a 105°C durante 3 horas.

Em seguida, iniciou-se o processo de extração das fibras, na qual os sachês foram colocados em um Erlenmeyer contendo 1000 mL de uma solução ácida preparada com 16 mL de H₂SO₄ a 1,25 % + 1000 mL de água destilada e foram levados à autoclave por 30 minutos a 100°C. Após essa etapa, a solução ácida foi descartada,

adicionou-se ao erlenmeyer com os sachês de amostras 1000 mL de água destilada e autoclavou-os novamente sob mesmas condições.

Por fim, após o descarte da água destilada, o Erlenmeyer foi preenchido com 1000 mL da solução básica composta por 25 mL de NaOH a 1,25 % e 1000 mL de água destilada e foi novamente autoclavado sob iguais condições. O processo de descarte da solução básica e adição de 1000 mL de água destilada para autoclavagem a 100°C por 30 minutos ocorreu em seguida.

Ademais, os sachês foram mergulhados em acetona para auxílio da secagem e foram colocados em estufa a 105°C durante 2 horas para, em seguida, serem pesados novamente.

O cálculo utilizado para obtenção de fibra bruta foi:

$$\% \text{ Fibras} = (\text{Pdg} - \text{Ps}) \div (\text{m}_{\text{úmida}} \times 100)$$

Em que:

Pdg = Peso da amostra após digestão e estufa (com sachê).

Ps = Peso do sachê vazio.

m_{úmida} = massa da amostra em base úmida.

4.4.1.6. Carboidrato

O teor de carboidratos (CHO) totais presentes na polpa e nas diferentes amostras das bebidas foi determinado pelo método 986.25 (AOAC, 2005) através da equação:

$$\% \text{CHO} = 100 - \% \text{Umidade} - \% \text{Proteína} - \% \text{Lipídio} - \% \text{Cinzas}.$$

4.5 Determinação do pH e acidez titulável das bebidas após a pasteurização

4.5.1. pH

O pH foi determinado por meio do pHmetro de bancada digital (modelo PHS – 3E), devidamente calibrado com solução tampão de pH 4 e pH 6,86. Com auxílio de

uma balança de precisão foram retirados 10 g de cada amostra, dispostas em béqueres de vidro para determinação do pH.

4.5.2. Acidez titulável

A acidez titulável (AT) das bebidas foi determinada de acordo com a metodologia descrita pelo Instituto Adolfo Lutz (IAL, 2008). Uma quantidade de 10g de cada amostra foram pesadas em uma balança, e nesta quantidade de cada amostra foram adicionados 100 mL de água destilada. Em seguida, realizou-se a titulação com solução de hidróxido de sódio (NaOH) de 0,1 M e adição do indicador de fenolftaleína. A acidez titulável total foi determinada com a seguinte equação:

$$\text{Acidez titulável} = V \times F \times M \times 100 / P$$

Em que:

V = volume de solução NaOH gasto na titulação (mL)

M = molaridade da solução

P = massa da amostra (g)

F = fator de correção da solução de NaOH

4.6 Caracterização físico-química e viabilidade de *L. paracasei* antes e durante o armazenamento

As bebidas com e sem adição do concentrado de células de *L. paracasei* foram avaliadas antes e durante o armazenamento a 4°C quanto às características físico-químicas e da viabilidade de *L. paracasei* LBC 81. As análises foram realizadas no tempo “zero” (antes do armazenamento) e durante 7, 14, 21 e 28 dias.

4.6.1 Análise da viabilidade de *L. paracasei* LBC 81

As bebidas adicionadas do concentrado de células de *L. paracasei* foram submetidas a diluições seriadas em eppendorfs contendo 900 µL de solução salina 0,85 %. Foram diluídos 100 µL em cada eppendorf até a diluição 10⁻⁷. As diluições 10⁻⁴, 10⁻⁵, 10⁻⁶ e 10⁻⁷ foram plaqueadas pela técnica *Drop plate* em placas contendo MRS ágar. Em

seguida, as placas foram incubadas em estufa bacteriológica a 37 °C por 24 horas. Após o período de incubação foi determinado o número de Unidades Formadoras de Colônias (UFC) (APHA, 2015).

4.6.2 Análise de pH e acidez titulável.

A análise de pH, acidez titulável foram realizadas nas bebidas com e sem adição do concentrado de células de *L. paracasei* conforme descrito nos itens 4.5.1, 4.5.2 respectivamente.

4.7. Análise de fenólicos totais e da atividade antioxidante dos sucos

As análises de fenólicos totais e de capacidade antioxidante foram realizadas nas amostras das bebidas de araticum com e sem adição do concentrado de células de *L. paracasei* nos tempos de armazenamento 0, 7, 14, 21 e 28 dias. As amostras foram diluídas em água MiliQ na proporção de 1:10, e filtradas em papel de filtro (J. Prolab, Qualy, poros de 14µm).

4.7.1. Fenólicos totais

A análise de fenólicos totais foi realizada de acordo com o protocolo estabelecido por Singleton e Rossi (1965), o qual baseia-se na capacidade dos compostos fenólicos reduzirem a mistura dos ácidos Fosfomolibdico / Fosfotúngstico em meio alcalino. O ensaio foi realizado em microplacas de 96 poços, a cada poço foram adicionados 20 µL das bebidas diluídas em água MiliQ (1:10), 100 µL da solução de Folin-Ciocalteu 10% e 80 µL de solução de Na₂CO₃ 7,5%. A reação foi incubada a temperatura ambiente por 1 hora com proteção a exposição da luz e a absorbância determinada a 765 nm em aparelho espectrofluorímetro (SpectraMax M Serie Multi-Mode Microplate Readers, San Jose, California). Uma curva padrão de ácido gálico nas concentrações de 0 a 1.000 µmol/L foi construída e a concentração de fenólicos totais das bebidas foi expressa µmol ácido gálico/L suco.

4.7.2. Potencial antioxidante redutor do Fe (FRAP)

O potencial redutor do Fe foi determinado segundo metodologia descrita por BENZIE; STRAIN, 1996. Em cada poço da microplaca foi montado uma reação contendo 18 µL de água MilliQ, 6 µL de amostra e 180 µL do reagente FRAP, e a leitura da absorbância monitorada a 593 nm por 10 min em espectrofluorímetro (SpectraMax M Serie Multi-Mode Microplate Readers, San Jose, California). Os ensaios foram feitos em duplicata, uma única reação denominada branco total foi feita utilizando 24 µL de H₂O milliQ e 180 µL de FRAP e para cada amostra foi montada uma reação identificada como branco específico da reação utilizando 198 µL de H₂O milliQ e 6 µL de amostra.

O reagente FRAP foi preparado a partir de: 15 mL de Tampão Acetato 0,3 mol/L; 1,5 mL de solução de 2,4,6-Tris(2-Pyridyl)-S-Triazine 10 mmol/L (TPTZ, Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, EUA) em HCl 40 mmol/L e 1,5 mL de solução aquosa de cloreto férrico 20 mmol/L. O reagente FRAP foi aquecido a 37°C por 30 minutos em banho-maria antes de ser adicionado a reação e estocado em frasco tipo âmbar.

Uma curva padrão de hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchromane-2-carboxylic acid (TROLOX) nas concentrações de 0 – 1.500 µmol/L foi construída e os resultados do potencial antioxidante das amostras expressos em µmol TROLOX / L suco (Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, EUA).

4.7.3. Capacidade de eliminação de radicais livres (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH[•]))

A capacidade de eliminação de radicais livres foi determinada utilizando o radical 2,2-difenil-1-picri-hidrazil (DPPH[•]) de acordo com método descrito Cheng; Moore e Yu (2006). Cada amostra foi analisada em cinco diferentes concentrações, obtidas a partir de 5, 10, 20, 25 e 30 µL da amostra para um volume final de 100 µL completado com H₂O MiliQ. O sistema reacional era composto por 100 µL de amostra, 100 µL do reagente DPPH[•] 0,208 mmol/L e a absorbância monitorada a 515 nm / 10 min. Para cada amostra foi feita uma reação correspondente ao branco específico substituindo o volume DPPH[•] por 100 µL de etanol absoluto. A cada experimento

realizado foi feita uma reação denominada branco total contendo somente 200 µL de etanol, e uma reação controle contendo 100 µL de etanol e 100 µL de DPPH• 0,208 mmol/L.

Uma curva padrão de hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchromane-2-carboxylic acid (TROLOX, Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, EUA) na faixa de concentração de 0 – 40 µmol/L foi construída e o potencial antioxidante das amostras calculado de acordo com a fórmula descrita abaixo:

$$DRSC = \text{AUC amostra} / \text{AUC TROLOX} \times [\text{amostra}] / [\text{TROLOX}] \text{ (}\mu\text{mol TROLOX / }\mu\text{L suco)}.$$

Onde: DRSC = capacidade relativa de eliminação do radical DPPH•; AUC = área abaixo da curva plotada a partir das variáveis “tempo de reação” x “% DPPH• eliminado”.

4.8. Determinação da sobrevivência de *L. paracasei* sob condições gastrointestinais *in vitro*

As bebidas de araticum adicionadas de concentrado de células de *L. paracasei* LBC 81 com 4 dias de armazenamento a 4°C foram submetidas às seguintes condições: (i) exposição ao suco gástrico simulado; (ii) exposição ao suco intestinal simulado; e (iii) exposição aos sucos gástrico e intestinal simulados em condições sucessivas (SANTOS, 2020). Antes da exposição às condições estabelecidas, as bebidas foram avaliadas quanto a viabilidade de *L. paracasei* de acordo com o procedimento descrito no item 4.6.1.

4.8.1. Simulação gástrica *in vitro* em condição estática

O suco gástrico sintético foi preparado de acordo com Bautista-Gallego et al (2013) com modificações. O suco gástrico foi produzido com NaCl (0,205 g/l), KH₂PO₄ (0,06 g/l), KCl (0,037 g/l) e água destilada. O pH foi ajustado para 2,0 com solução de HCl 1 M, e posteriormente a solução foi autoclavada a 121 °C por 15 minutos. Na solução autoclavada foi adicionada solução de pepsina (0,0133 g/l) (Dinâmica®, Idaiatuba-SP, Brasil) filtrada no momento da execução do experimento.

Alíquotas de 500 µL da bebida foram adicionadas em 500 µL do suco gástrico e em seguida, incubadas em estufa bacteriológica a 37 °C por 90 minutos. O tempo de

exposição ao suco gástrico foi de acordo ao estabelecido por Calabuig-jiménez et al. (2019). Após período de incubação foram imediatamente centrifugados (7871g, 4 °C, 5 minutos). O *pellet* obtido foi lavado com solução salina 0,85 % e posteriormente centrifugado nas mesmas condições. O processo de lavagem foi repetido mais uma vez e após o descarte do sobrenadante, *pellet* foi suspenso em solução salina 0,85% para a realização das diluições até 10^{-6} . As diluições foram plaqueadas em placas de Petri contendo ágar MRS pela técnica *Drop Plate*, e, posteriormente, incubadas em condição aeróbia a 37°C por 48 horas. O número de UFC foi determinado após o período de incubação e expressos em log UFC/mL.

4.8.2. Simulação intestinal *in vitro* em condição estática

O suco pancreático sintético foi preparado de acordo com Bautista-Gallego et al (2013) com modificações. O suco pancreático foi produzido com fosfato de sódio dibásico (5,081 g/l), NaCl (0,850 g/l), sais biliares (0,300 g/l) e água destilada. O pH da solução foi ajustado para 8,0 com solução de NaOH 1 M, e posteriormente a solução foi autoclavada a 121 °C por 15 minutos. Na solução autoclavada foi adicionada solução de pancreatina (0,1 g/l) (Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, EUA) filtrada no momento da execução do experimento.

Alíquotas de 500 µL da bebida foram adicionadas em 500 µL do suco pancreático e em seguida, incubadas em estufa bacteriológica a 37 °C por 90 minutos. O tempo de exposição ao suco pancreático foi de acordo ao estabelecido por Calabuig-Jiménez et al (2019). Após período de incubação os tratamentos foram imediatamente centrifugados (7871g, 4 °C, 5 minutos). O *pellet* obtido foi lavado com solução salina 0,85 % e posteriormente centrifugado nas mesmas condições. A etapa de lavagem repetiu-se mais uma vez e após o descarte do sobrenadante, o *pellet* foi suspenso em solução salina 0,85% para a realização das diluições até 10^{-6} . As diluições foram plaqueadas em placas de Petri contendo ágar MRS pela técnica *Drop Plate*, e, posteriormente, incubadas em condição aeróbia a 37 °C por 48 horas. O número de UFC foi determinado após o período de incubação e expressos em log UFC/mL.

4.8.3. Sucessão gástrica e intestinal *in vitro* em condição estática

Alíquotas de 500 µL da bebida foram adicionadas em 500 µL do suco gástrico e em seguida, incubadas em estufa bacteriológica a 37 °C por 90 minutos. Posteriormente, as amostras foram centrifugadas (7871g ,4 °C, 5 minutos), e o sobrenadante foi descartado. Ao *pellet* obtido foi adicionado 1 mL do suco pancreático, e em seguida as amostras foram incubadas a 37°C por 90 minutos. Em seguida, as amostras foram centrifugadas nas mesmas condições mencionadas anteriormente, e o *pellet* obtido foi lavado duas vezes com solução salina 0,85% e centrifugado nas mesmas condições. O *pellet* obtido foi suspenso em 1 mL de solução salina, e em seguida foi realizado o procedimento para plaqueamento em placas contendo MRS agar de acordo com o procedimento descrito nos itens 4.7.2 e 4.7.3

4.9. Análise estatística

O desenho experimental do estudo inclui 3 formulações de suco de araticum e cinco diferentes medidas em intervalos de tempo de armazenamento (exceto para análise de composição centesimal e de sobrevivência a condições simuladas do trato gastrointestinal). Todos os experimentos foram realizados três vezes, e os resultados foram apresentados como média \pm erro padrão. A análise de variância (ANOVA), e o teste de Tukey foram usados para calcular diferenças significativas em $p < 0.05$. Os dados analisados em intervalos de tempo de armazenamento também foram submetidos a análise de regressão. As análises foram realizadas usando o software SAS (SAS Institute Inc., Cary NC, versão 9.4).

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. Composição centesimal da polpa de araticum e das formulações dos sucos

A composição centesimal dos sucos de araticum (sem adição de bactéria) contendo 20%, 30% e 40% de polpa e água mineral foi avaliada logo após o preparo. Também, foi analisada a composição centesimal da polpa de araticum (Tabela 3).

Tabela 3. Composição centesimal do suco e polpa de araticum.

Variáveis	Formulações (F)				p = valor
	F1	F2	F3	Polpa	
Umidade (%)	95,6 a	93,82 b	92,01 c	73,08 d	< 0,0001
Lipídeos (%)	0,30 d	0,51 c	0,80 b	2,31 a	< 0,0001
Proteínas (%)	0,21 c	0,29 bc	0,43 b	1,37 a	< 0,0001
Cinzas (%)	0,12 b	0,19 b	0,27 b	0,77 a	< 0,0001
Fibras (%)	0,34 b	0,46 b	0,64 b	3,55 a	< 0,0001
Carboidratos (%)	3,18 d	4,74 c	5,86 b	18,93 a	< 0,0001

F1 = 20% de araticum; F2 = 30% de araticum; F3 = 40% de araticum. Médias seguidas de mesma letra não diferem significativamente ($p > 0,05$) entre si pelo teste Tukey.

As variáveis analisadas na polpa de araticum e nas formulações de suco apresentaram diferenças significativas ($P < 0,05$) quando comparadas. Destacam-se os maiores percentuais de carboidratos e fibra bruta presentes na polpa do araticum e nas formulações, e também os menores percentuais de proteínas e lipídeos.

Os valores de umidade apresentaram diferenças significativas ($p < 0,05$), ou seja, quanto menor o percentual de polpa, utilizada na produção dos sucos, maior a umidade das formulações. Bem como, ainda menor, a umidade na polpa por ter sido avaliada pura, sem a adição de água. Quanto ao resíduo mineral (cinzas), não houve diferença significativa entre as três formulações ($p > 0,05$). Somente a análise de cinzas da polpa foi superior, apresentando diferença significativa ($p < 0,05$) em relação aos sucos, como já seria esperado, uma vez que se trata de uma amostra mais concentrada.

Em relação ao teor de proteína das amostras, foi observado maior conteúdo na formulação elaborada com 40% de polpa de araticum (0,43%), apresentando diferença significativa ($p < 0,05$) em relação às formulações de 30% e 20% que continham 0,21% e 0,29%, respectivamente. A polpa pura apresentou quantidade de proteína superior à

todas as formulações ($p < 0,05$), contendo 1,37% desse macronutriente em 100g do alimento, o que corrobora com o estudo de Arruda e Pastore (2019), que constataram 1,27% na mesma quantidade de amostra, assim como esperado para frutas, que normalmente apresentam conteúdo de proteína variável e escasso (BATES et al., 2001).

A quantidade de carboidratos nas formulações de suco foi de 3,18% na F1, 4,74% na F2, 5,86% na F3 e 18,93% na polpa, apresentando diferença significativa ($p < 0,05$) entre todas elas. Tal nutriente é o de maior predominância tanto na polpa de fruta, quanto nos sucos produzidos no presente estudo. A redução do teor de hidratos de carbono nas formulações se dá pela diluição progressiva de cada uma delas, o que também justifica a diferença significativa ($p < 0,05$) do maior teor desse nutriente na amostra de polpa em relação as formulações dos sucos. Outro estudo confirma o achado do teor deste macronutriente na polpa de araticum, o qual constatou 18,65% em 100g (ARRUDA; PASTORE, 2019). Tal característica poderia beneficiar a cepa *L. paracasei* utilizada no presente estudo, uma vez que se trata de uma bactéria que apresenta metabolismo fermentativo, que utiliza a glicose como principal fonte de energia (AYIVI et al., 2020).

Na polpa de araticum, obteve-se um percentual de 3,55% de fibra bruta. Outro estudo que utilizou a mesma metodologia de análise de fibra bruta, obteve na polpa de araticum um percentual de 2,35% de fibra bruta (DE LIMA et al., 2016). Os teores de nutrientes dos frutos podem variar de acordo com a localização geográfica e estado de maturação da colheita (DE LIMA et al., 2016). Já nas formulações de suco de araticum foram identificados 0,34% na F1; 0,46% na F2 e 0,64% na F3. Dessa forma, não houve diferença significativa ($P > 0,05$) entre as formulações, porém a polpa apresentou maior teor de fibras se comparada às três formulações de suco ($p < 0,05$), o que provavelmente, deveu-se à passagem da mistura em voal no momento do preparo, resultando em resíduos que foram descartados. Contudo, essa parte do processo foi indispensável para a execução da metodologia, uma vez que os resíduos obstruiriam as ponteiros utilizadas durante a pipetagem e impossibilitariam a leitura em espectrofluorímetro. Além disso, esse processamento proporcionou uma consistência mais agradável ao suco e mesmo assim ainda manteve parte da fibra do produto. Anteriormente, sem esse processo, obteve-se uma textura de purê e não de suco. Vale ressaltar que outro estudo comprovou que parte das fibras contidas no araticum são oligossacarídeos prebióticos, o que poderia beneficiar a viabilidade do probiótico inoculado nos sucos (ARRUDA; PEREIRA; PASTORE, 2017b).

Entre todos as formulações e polpa houve diferença significativa ($p < 0,05$) em relação ao teor de lipídeos, sendo 0,30% na F1, 0,51% na F2, 0,80% na F3 e 2,31% na polpa do araticum. Outros estudos constataram 2,57%, 2,40%, 3,83% e 3,78% de lipídeos na polpa de araticum. Tais variações são esperadas, pois a composição dos frutos pode variar de acordo com a região de plantio devido à diferença de nutrientes disponíveis no solo e clima por exemplo. Os lipídeos representam o terceiro nutriente de maior predominância dessa fruta (SILVA et al., 2008; DE LIMA et al., 2016; DE AGUIAR et al., 2019; ARRUDA; PASTORE, 2019).

Ademais, não existem outros estudos que produziram bebidas de araticum com a mesma composição dos produtos dessa pesquisa, por isso, a comparação com a literatura foi realizada somente em relação a polpa.

5.2. Viabilidade de *L. paracasei* LBC-81 e variáveis associadas a atividade da estirpe durante o armazenamento.

5.2.1. Viabilidade de *L. paracasei*

A Figura 1 demonstra o comportamento em relação a viabilidade de *L. paracasei* LBC-81 nas formulações de suco contendo 20%, 30% e 40% de polpa de araticum durante os 28 dias de armazenamento sob refrigeração a 4°C. E, a Tabela 4 traz as equações de regressão referentes à viabilidade de *L. paracasei*, pH, titulável acidez, fenólicos totais, FRAP e DPPH durante o armazenamento do suco de araticum.

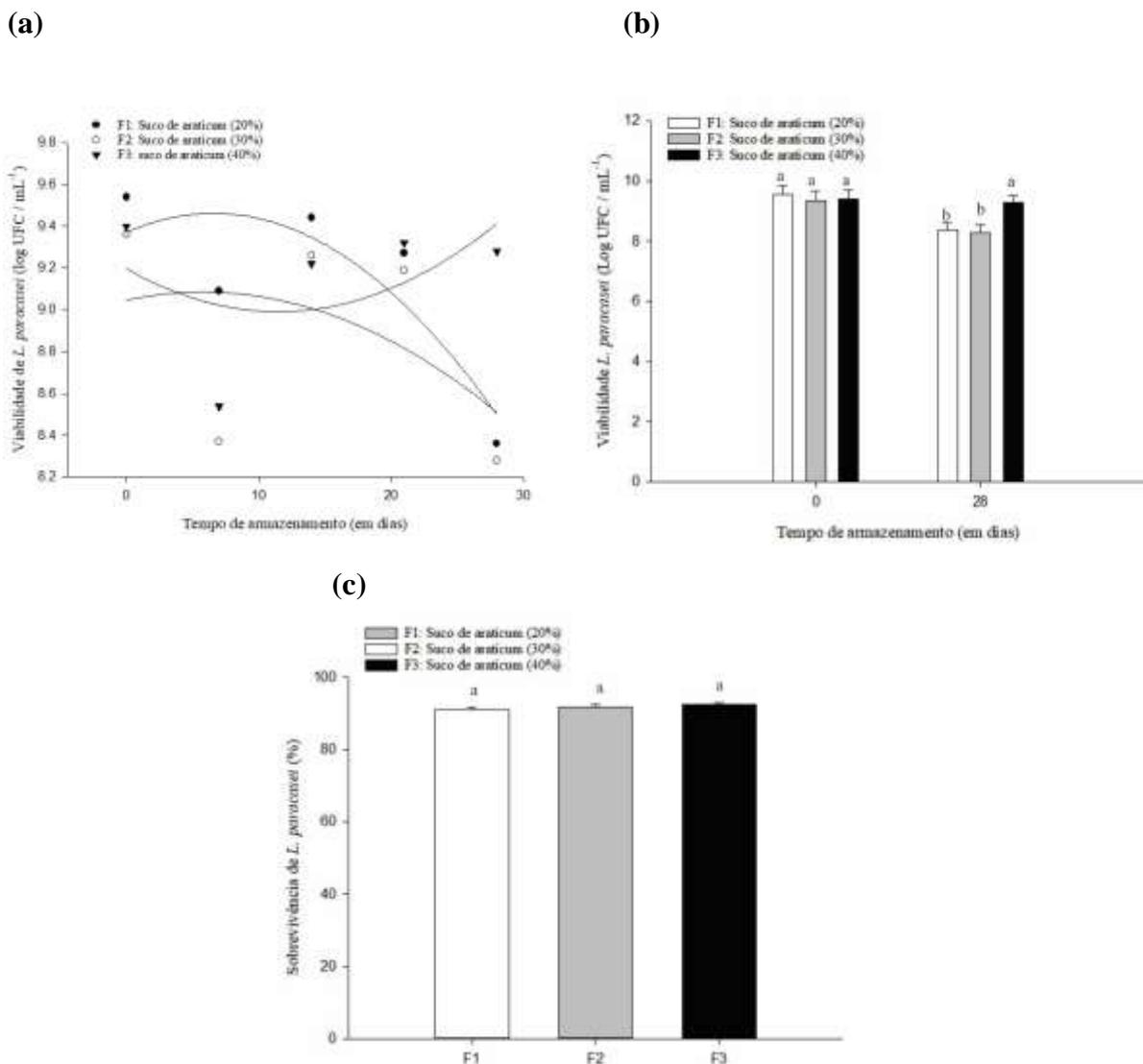


Figura 1. Comportamento de *L. paracasei* LBC-81 durante 28 dias de armazenamento a 4°C (a), viabilidade de *L. paracasei* nas três formulações (F1, F2 e F3) antes

do armazenamento e com 28 dias de armazenamento (b) e efeito da formulação, independente do tempo de armazenamento, na viabilidade de *L. paracasei* (c).

Tabela 4. Equações de regressão referentes à viabilidade de *L. paracasei*, pH, titulável acidez, fenólicos totais, FRAP e DPPH durante o armazenamento do suco de araticum.

Variáveis	Formulações (F)	Equação de regressão	r ²	EPM
Viabilidade	F1	$\hat{y} = 9,3703 + 0,0276x - 0,0021x^2$	0,71	0,35
	F2	$\hat{Y} = 9,045 + 0,0135x - 0,0012x^2$	0,20	0,65
	F3	$\hat{y} = 9,1954 - 0,0356x + 0,0015x^2$	0,22	0,43
pH	F - com bactéria	$\hat{y} = 4,0949 - 0,00562x + 0,0010 x^2$	0,97	0,07
	F - sem bactéria	$\hat{y} = 4,5246 - 0,0046x$	0,62	0,04
Ácidos totais	F - com bactéria	$\hat{y} = 4,1280 + 0,1434x$	0,92	0,53
	F - sem bactéria	$\hat{y} = 2,6203 + 0,0067x - 0,0007x^2$	0,20	0,44
Fenólicos totais	F1 - com bactéria	$\hat{y} = 2288,7666 - 13,9071x$	0,87	65,66
	F1 - sem bactéria	$\hat{y} = 2287,2000 - 29,6977x$	0,88	139,85
	F2 - com bactéria	$\hat{y} = 4331,1000 - 36,1452x$	0,84	198,29
	F2 - sem bactéria	$\hat{y} = 4096,3333 - 58,7000x$	0,91	227,30
	F3 - com bactéria	$\hat{y} = 4298,3190 - 5,8340x + 0,5199x^2$	1,00	0,00
	F3 - sem bactéria	$\hat{y} = 4751,5333 - 55,7405x$	0,82	3,31
	F1 - com bactéria	$\hat{y} = 1901,1673 - 15,7500x$	1,00	0,00
	F1 - sem bactéria	$\hat{y} = 2046,3817 - 99,6568x + 2,0991x^2$	1,00	0,00
	F2 - com bactéria	$\hat{y} = 3050,7240 - 28,2540x$	0,91	109,16
	F2 - sem bactéria	$\hat{y} = 2955,4835 - 123,0825x + 2,6393x^2$	0,91	253,33
FRAP	F3 - com bactéria	$\hat{y} = 2922,8886 - 10,4682x$	1,000	25,10
	F3 - sem bactéria	$\hat{y} = 3212,4426 - 66,2658x$	0,82	3,66
DPPH	F1	$\hat{y} = 16,0275 - 0,3590x + 0,0085x^2$	0,88	0,79
	F2	$\hat{y} = 22,9089 - 0,5631x + 0,0105x^2$	1,000	0,00
	F3	$\hat{y} = 24,6366 - 0,2930x$	0,89	1,26
DPPH	FC - com bactéria	$\hat{y} = 20,7836 - 0,4205x + 0,0093x^2$	0,94	0,66
	FS - sem bactéria	$\hat{y} = 21,2608 - 0,2937x$	0,90	1,24

EMP: erro padrão da média.

F1: suco de araticum (20%); F2: suco de araticum (30%); F3: suco de araticum (40%); FC: suco de araticum com bactéria; FS: suco de araticum sem bactéria.

Antes do armazenamento, as três formulações de suco de araticum não apresentaram diferença significativa ($P>0,05$) em relação à população viável de *L. paracasei* (Figura 1b), o que indica que foi adicionada a mesma quantidade de concentrado de *L. paracasei*.

Assim, ao longo dos 28 dias de armazenamento, por se tratar de um meio complexo e de um estudo que envolve crescimento microbiano, era esperado um comportamento de crescimento não uniforme. Desta forma, na Figura 1a, observa-se que a população de *L. paracasei* nos sucos com 20% e 30% de polpa demonstra tendência de decréscimo segundo a equação quadrática (Figura 1a e Tabela 4). Já no suco de araticum com 40% de polpa, houve tendência de redução de *L. paracasei* no período inicial do armazenamento, mas por volta do 14º dia, observou-se o aumento da população da estirpe segundo a equação quadrática (Figura 1a e Tabela 4).

Ademais, no momento inicial do armazenamento, a contagem de *L. paracasei* era de 9 unidades logarítmicas. Ao final do armazenamento (28º dia), a formulação 3 (40% de polpa) foi a que apresentou maior ($p<0,05$) população de *L. paracasei* quando comparada as formulações F1 e F2. Contudo, as três formulações mantiveram-se contagem de UFC acima de 8 unidades logarítmicas até o final da vida útil, o que representa bom nível para probiótico de acordo com a recomendação para sucos probióticos que estabelece teor mínimo de 8 log UFC / mL (ANVISA, 2019). Vale ressaltar que os sucos não foram acrescidos de nenhum outro componente como prebióticos ou açúcares, continham somente polpa de araticum, por isso, tal fruta parece ser um meio propício para a viabilidade de *L. paracasei* LBC-81.

Em complementação, na Figura 1b observa-se a comparação entre as médias da viabilidade de *L. paracasei* das três formulações no período inicial (0 dias) e final (28 dias) de armazenamento a 4°C. Constata-se que a F1 e a F2 apresentaram redução significativa ($p < 0,05$) da viabilidade do probiótico e que a F3 foi a única que não apresentou redução significativa ($p > 0,05$). O que sugere o percentual de 40% como o meio mais favorável a viabilidade da cepa *L. paracasei*.

Na Figura 1c, os valores médios de sobrevivência de *L. paracasei* foram comparados quando presentes nas três formulações. Observou-se que o aumento do percentual de polpa de araticum nas formulações não afetou significativamente ($p > 0,05$) a sobrevivência de *L. paracasei*. Tal constatação se faz importante, pois o araticum é rico em antioxidantes, o que poderia prejudicar a sobrevivência da bactéria.

Resultado diferente foi obtido por Oliveira e colaboradores (2021) que observaram diferença na viabilidade de *L. rhamnosus* GG, *L. plantarum* LP299V e *L. acidophilus* LA-14 quando inoculados em diferentes concentrações de polpa de manga e cenoura. Na formulação que continha uma parte de manga para uma parte de cenoura, foi possível verificar maior viabilidade. Segundo os autores, essa combinação proporcionou um maior teor de fibras o que influenciou significativamente a sobrevivência das estirpes após o processamento e durante a vida útil do produto. Fibras solúveis podem ser usadas como substratos para crescimento de microrganismos probióticos e fibras insolúveis podem apresentar efeito protetor sobre essas bactérias.

Ademais, no presente estudo, a redução da viabilidade de *L. paracasei* ao longo do tempo pode ser explicada pelo meio ácido que o araticum proporcionou. Tal condição pode ser prejudicial a viabilidade das cepas probióticas (KUIPERS et al., 2002), além de fatores como a presença de antioxidantes e compostos fenólicos do araticum que possuem ação antimicrobiana (BENSID et al., 2022). Ademais, durante o período de armazenamento a 4°C, os sucos podem estar suscetíveis a ação de espécies reativas do oxigênio que danificam proteínas, lipídeos e ácidos nucleicos, constituindo assim uma das principais causas de morte celular (KUIPERS et al., 2002).

Entretanto, as bactérias possuem mecanismos de adaptação a esses estresses proporcionados pelo meio em que se encontram, o que poderia explicar a tendência de recuperação no suco contendo 40% de araticum. Dentre as explicações, a primeira seria a de que o maior teor de carboidratos da F3 proveniente da polpa de araticum, poderia justificar a recuperação da viabilidade ao longo do tempo, pois esse nutriente serviria de substrato para as bactérias, uma vez que representam a principal fonte de energia para o seu metabolismo (HILL et al., 2018).

Outras justificativas para a recuperação da viabilidade observada ao longo do armazenamento seria de que algumas cepas de BALs podem apresentar mecanismos de correção no citoplasma quando este encontra-se ácido, como por exemplo a utilização de prótons do seu próprio meio interno para a produção de energia (ATP) e expulsão desses prótons para a neutralização do pH interno. Algumas bactérias também possuem três enzimas (arginina deiminase, ornitina carbamoiltransferase e carbamato quinase) que catalisam compostos ácidos e neutralizam o interior da célula. Além disso, bactérias podem alterar o perfil de lipídeos que compõem suas membranas produzindo o biofilme, que reduz a entrada de prótons do meio externo e protege do estresse ácido, calor e oxidação. Também existem mecanismos de reparo do DNA de células já

danificadas para a recuperação da bactéria após o estresse ácido (L-ATR) (KUIPERS et al., 2002).

Vários estudos têm avaliado a viabilidade de diferentes estirpes probióticas em sucos de fruta. Da COSTA et al. (2017) produziram um suco de laranja não fermentado suplementado com a estirpe probiótica de *Lactobacillus paracasei* ssp. *paracasei* (*L. casei*-01, Christian Hansen ®) e avaliaram a viabilidade desta estirpe por 28 dias de armazenamento a 4°C. A população inicial de células viáveis da estirpe probiótica estava acima de 7 log UFC/mL e ao final dos 28 dias a população de células viáveis manteve-se em torno de 7 log UFC/mL. Como utilizou o parâmetro mínimo de 6 log UFC / mL, foi considerado adequado como bebida probiótica concluindo que o suco de laranja foi um meio propício para a viabilidade de *L. paracasei*.

Outro estudo utilizou a cepa *Lactobacillus paracasei* ssp. (*L. casei*-01) inoculado em suco de uva branca não fermentado, a qual manteve a viabilidade dentro dos parâmetros mínimos considerados pelo estudo até o dia 21 dias de armazenamento a 4°C por 28 dias, sendo considerada uma bebida probiótica somente se consumida dentro desse período, pois houve redução de 5 log no 28º dia (OKINA et al., 2018).

Por fim, Mantzourani et al. (2022) inocularam a estirpe que apresenta potencial probiótico *L. paracasei* SP3 em suco de romã fermentado e obtiveram a contagem no início do armazenamento de 9,2 log UFC/mL e de 7,2 log UFC/mL na 4ª semana de armazenamento. Mesmo em condições ácidas proporcionadas pelo suco, tais resultados de viabilidade estavam acima do limite de 6–7 log UFC/mL, que é necessário de acordo com a bibliografia utilizada pelo estudo. Além disso, esses autores trouxeram a observação de que a estabilidade do probiótico em suco de frutas é um importante agente contra a proliferação de microrganismos deteriorantes, como fungos e leveduras, os quais podem alterar as características e o valor nutricional dos produtos (MANTZOURANI et al., 2022).

Vale ressaltar que o parâmetro mínimo para a concentração de probióticos em sucos não é bem estabelecido pela literatura. É possível observar que cada estudo utiliza uma adequação que normalmente varia entre 6 e 8 log UFC / mL como parâmetro mínimo recomendado. Na presente pesquisa, decidiu-se utilizar o parâmetro de pelo menos 8 log UFC / mL.

5.3. pH e acidez titulável

As diferentes formulações de suco de araticum com e sem adição de bactéria foram armazenados a 4 °C e analisadas ao longo de 28 dias de armazenamento quanto ao pH e acidez (Figura 2).

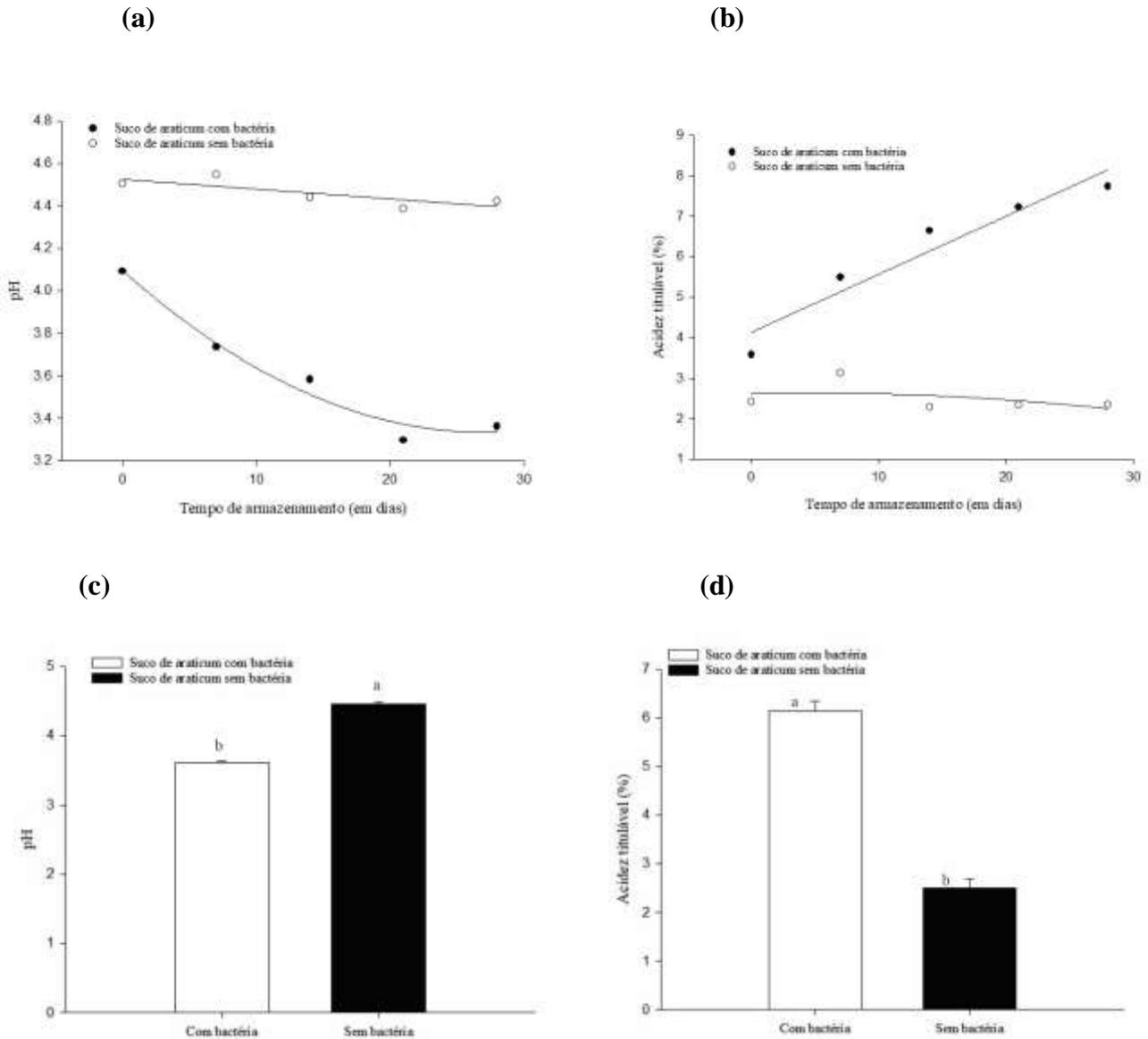


Figura 2. Comportamento do pH (a) e acidez titulável (b) nas três formulações de suco de araticum (F1, F2 e F3) com e sem bactéria durante 28 dias de armazenamento a 4°C, variação do pH (c) e acidez titulável (d) em suco de araticum com e sem adição da bactéria e valores de pH (e) e acidez titulável (f), independente do tempo de armazenamento, nas formulações de suco de araticum (F1, F2 e F3).

Ao longo do período de análises, o pH dos sucos adicionados do concentrado de células probióticas apresentou uma variação entre 4 e 3,2, enquanto o pH do suco de

araticum não suplementado com a bactéria manteve-se entre 4,5 e 4,3. A Figura 2a demonstra o pH do suco de araticum com e sem probiótico ao longo dos 28 dias de armazenamento a 4°C. Por meio dele é possível observar uma tendência de redução do pH nos sucos com e sem adição de bactéria, porém com a curva decrescente mais acentuada no grupo dos sucos adicionados de bactéria.

Na Figura 2, os valores médios de pH dos sucos com e sem bactéria confirmam o pH mais baixo dos sucos adicionados de bactéria, apresentando um pH significativamente ($P < 0,05$) menor. Consequentemente, observa-se maior acidez ($p < 0,05$) das formulações com bactérias expressa pelo Figura 2d. Tal observação pode ser justificada pelo fato de os probióticos poderem metabolizar açúcares simples encontrados em sucos de frutas, e assim aumentarem a acidez do produto (SENGUN et al., 2020).

Os resultados de viabilidade de *L. paracasei* nas formulações de suco podem ser correlacionados com os resultados de pH (Figura 2a e 2c) e acidez titulável (Figura 2b e 2d). O pH do suco de araticum adicionado de concentrado de *L. paracasei* diminuiu até aproximadamente o 21º dia de armazenamento de acordo com a equação quadrática (Tabela 2). A partir do 21º dia observou-se tendência à estabilidade do pH (Figura 2a). A acidez do suco de araticum com o concentrado de células apresentou aumento descrito pela equação linear (Figura 2b e Tabela 2). O pH (Figura 2c) e a acidez (Figura 2d) apresentaram valores significativamente ($P < 0,05$) menores e maiores, respectivamente, no suco de araticum com o concentrado de bactérias em relação ao suco de araticum sem bactérias

Estes dados sugerem a ocorrência de fermentação dos sucos pela bactéria. Apesar de esse não ser o objetivo do presente trabalho, a fermentação ocorreu mesmo em condição de temperatura não favorável como é o caso da refrigeração (4°C). Entretanto, esse ocorrido reforça o araticum como um meio potencialmente propício para o desenvolvimento da bactéria em questão, uma vez que mesmo em condições adversas, pode ter oferecido nutrientes para o crescimento microbiano. Além disso, os ácidos orgânicos oriundos da fermentação contribuem para o sabor e a palatabilidade dos sucos de frutas. E, a maior acidez dos produtos probióticos pode proteger os sucos do desenvolvimento de microrganismos deterioradores de alimentos, aumentando assim sua vida útil. Tais alterações são desejáveis desde que não afete as características sensoriais ou tecnológicas dos produtos (PIMENTEL et al., 2015).

Apesar das BAL's serem neutrófilos, ou seja, pH ótimo de crescimento entre 5 e 9, muitas vezes, esse grupo de bactérias adaptam a expressão de seus genes de acordo com o ambiente que estão, por meio de diferentes processos celulares, como por exemplo divisão celular, metabolismo do DNA, composição da membrana, transportes de ácidos do meio intracelular para o meio extracelular (KUIPERS et al., 2002). Um dos grandes desafios à inoculação de probióticos em sucos é o baixo pH, contudo, muitas bactérias probióticas parecem ser tolerantes ao meio com maior acidez (MANTZOURANI et al., 2022).

Em comparação, o suco de laranja fermentado que recebeu o inóculo de *Lactobacillus rhamnosus* ATCC 53103 teve um pH em torno de 3,6 e acidez em torno de 1,4 ao longo do armazenamento por 28 dias a 4^oC e mesmo em meio ácido o probiótico apresentou contagem acima da recomendação mínima para ser considerado probiótico. Segundo o estudo, essa acidificação do meio ocorre pelo fato dessas bactérias poderem metabolizar açúcares simples e convertê-los em ácidos orgânicos (SENGUN et al., 2020). O suco fermentado de uma espécie de maçã denominada Changfu com pH de 3,89 apresentou-se como um meio viável para o cultivo de *Lactobacillus acidophilus* CICC6005, *Lactobacillus plantarum* CICC21805 e *Lactobacillus fermentum* CICC21828 (PENG et al., 2021).

Em contrapartida, um estudo que utilizou o suco de uva para a inoculação de *Lactobacillus paracasei* (FD-DVS nu-trish® *L. casei*-01, Chr. Hansen, Denmark) e foi armazenado por 28 dias sob refrigeração, teve redução da viabilidade estatisticamente significativa, passando de 9,0 log UFC/mL para 5,9 log UFC/mL em 14 dias. Tal redução foi associada pelos autores ao baixo pH da bebida (aproximadamente 3,3). Nesse último caso, outros fatores podem ter interferido negativamente no resultado como por exemplo, a estirpe talvez não ser resistente ao meio ácido ou pelo fato da uva ser rica em antioxidantes e esses compostos terem agido como antimicrobianos (SILVA et al., 2008).

5.4. Compostos fenólicos totais e atividade antioxidante

Os sucos de araticum foram armazenados a 4 °C e analisados durante 28 dias quanto aos fenólicos totais presentes e quanto a atividade antioxidante através do FRAP e DPPH e os resultados foram descritos na Tabela 3 e Figuras 3, 4 e 5.

Tabela 3. Atividade antioxidante do suco de araticum (com e sem bactéria) durante o armazenamento.

Tempo de armazenamento (em dias)	Com/sem bactéria	Fenólicos totais (µmol ácido gálico/L suco)			FRAP (nmol TROLOX/L suco)		
		F1	F2	F3	F1	F2	F3
0	Com	2246,67 ± 408,84 b	4200,67 ± 408,84 a	4343,83 ± 143,78 a	1868,61 ± 92,01 b	3169,17 ± 92,01 a	2927,77 ± 92,01 a
7		2254,33 ± 408,84 b	4172,50 ± 143,78 a	4298,50 ± 143,78 a	1909,17 ± 92,01 b	2722,22 ± 92,01 a	2821,39 ± 92,01 a
14		2121,66 ± 408,84 b	4047,17 ± 408,84 a	3998,83 ± 143,78 a	1573,87 ± 92,01 b	2606,94 ± 92,01 a	2806,66 ± 92,01 a
21		1921,17 ± 408,84 c	3366,33 ± 143,78 b	4815,83 ± 143,78 a	1559,44 ± 92,01 b	2472,22 ± 92,01 a	2707,50 ± 92,01 a
28		1926,50 ± 408,84 c	3338,67 ± 143,78 b	4390,50 ± 143,78 a	1492,22 ± 92,01 b	2305,28 ± 92,01 a	2618,33 ± 92,01 a
0	Sem	2360,83 ± 408,84 c	4336,33 ± 408,84 b	4941,67 ± 143,78 a	2043,89 ± 92,01 b	3064,44 ± 92,01 a	3592,50 ± 92,01 a
7		2014,50 ± 408,84 c	3488,17 ± 143,78 b	4240,67 ± 143,78 a	1458,61 ± 92,01 c	2013,06 ± 92,01 b	2345,55 ± 92,01 a
14		1909,33 ± 408,84 c	3126,17 ± 408,84 b	3590,67 ± 143,78 a	1056,66 ± 92,01 c	1726,39 ± 92,01 b	2043,88 ± 92,01 a
21		1487,66 ± 408,84 c	2792,17 ± 143,78 b	3943,50 ± 143,78 a	880,28 ± 92,01 c	1775,83 ± 92,01 b	1991,39 ± 92,01 a
28		1584,83 ± 408,84 c	2629,83 ± 143,78 b	3139,33 ± 143,78 a	902,22 ± 92,01 b	1461,66 ± 92,01 a	1450,28 ± 92,01 a

F1 = Suco de araticum (20%); F2 = suco de araticum (30%); F3 = suco de araticum (40%).

As médias seguidas pela mesma letra na linha dentro de cada grupo de formulação não apresentam diferença significativa ($p > 0.05$) pelo teste de Tukey.

5.4.1. Compostos fenólicos totais

Os compostos fenólicos totais foram analisados nos sucos de araticum com e sem *L. paracasei* durante os 28 dias de armazenamento e os resultados estão descritos na Figura 3.

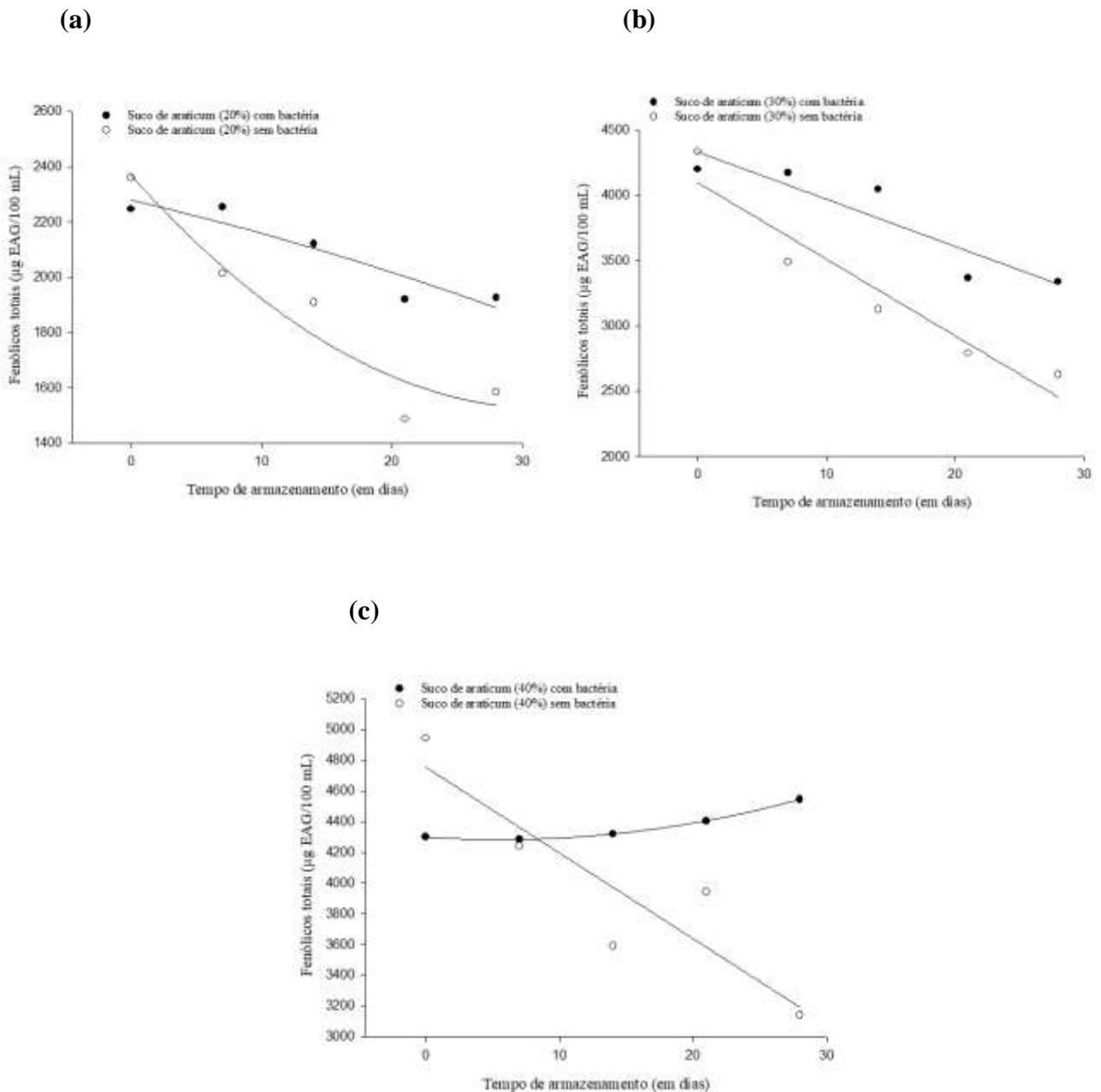


Figura 3. Quantificação de fenólicos totais em suco de araticum com 20% de polpa (a), 30% de polpa (b) e 40% de polpa (c) com e sem adição de bactéria durante 28 dias de armazenamento a 4°C.

Os resultados da análise de compostos fenólicos totais (Figura 3 e Tabela 3) demonstram quantidades iniciais proporcionais ao percentual de polpa de araticum, ou seja, quanto mais polpa, maior a quantidade de fenólicos na bebida no primeiro momento do armazenamento.

Ao longo dos 28 dias de armazenamento, observou-se tendência de decréscimo (Figura 3 e Tabela 3). A redução da quantidade de fenólicos já era esperada, pois a presença de oxigênio dissolvido nos sucos pode resultar na oxidação de compostos fenólicos (PATTHAMAKANOKPORN et al., 2008).

Bem como a ativação da enzima polifenoloxidase endógena durante o armazenamento do suco ou a presença de íons metálicos como ferro e cobre podem resultar na oxidação de compostos fenólicos. A determinação do teor de fenólicos totais pelo método de Folin-Ciocalteu é baseada em uma reação redox, portanto, a capacidade de redução de polifenóis oxidados é enfraquecida, gerando valores de resultado mais baixos (MILLET et al., 2017). Patthamakanokporn et al. (2008) observaram que na ausência de luz e oxigênio, o teor de compostos fenólicos não mudou consideravelmente durante o período de armazenamento refrigerado. Como os sucos não foram armazenados em garrafas que bloqueavam a entrada de luz, e não foram criadas condições para impedir a entrada de oxigênio, é provável que esses fatores possam ter contribuído para a redução dos fenólicos totais durante o armazenamento.

Entretanto, é possível observar (Figura 3) que a tendência de decréscimo dos compostos fenólicos é menos acentuada nos sucos que continham o concentrado de *L. paracasei*. E ainda, que no suco com 40% de polpa de araticum com bactéria houve tendência de estabilização dos compostos fenólicos ao longo do armazenamento (Figura 3c), o que é ratificado pela diferença não significativa ($p > 0,05$) expressa na Tabela 3, onde a quantidade inicial (tempo 0) de fenólicos totais é de 4343.83 $\mu\text{g EAG}/100\text{ mL}$ e a final (tempo 28) é de 4390.50 $\mu\text{g EAG}/100\text{ mL}$. Nas demais concentrações de polpa com bactéria, houve redução dos compostos fenólicos ao longo do período de armazenamento, uma vez que observa-se diferença significativa ($p < 0,05$) entre o tempo 0 e o tempo 28 no grupo com bactérias da F1 e F2 (Tabela 3).

Os resultados obtidos quanto ao teor de fenólicos totais nos sucos de araticum podem ser correlacionados com a viabilidade de *L. paracasei* durante o armazenamento. Possivelmente, a preservação dos compostos fenólicos ocorreu pela atividade bacteriana proporcionada pela fermentação natural observada durante o armazenamento (ZHANG et al., 2021).

Gumus & Demirci (2022) atribuem o aumento do teor de fenólicos no suco de uva fermentado por *Lactobacillus fermentum* à capacidade de enzimas como β -galactosidase e α -amilase, produzidas por essa bactéria, em hidrolisar fenólicos ligados a açúcares em fenólico no suco. Já foi afirmado que uma cepa de *Lactobacillus paracasei* foi eficaz em bioconversões fenólicas devido ao seu alto teor de β -glicosídeo e β -galactosídeo (BONTSIDIS et al., 2021; ZHAO; SHAH, 2014).

Sabe-se que os compostos fenólicos podem atuar como agentes protetores ou antimicrobianos. Assim, a diminuição do teor de fenólicos totais durante o armazenamento possivelmente permitiu uma alta população de *L. paracasei* nos sucos (SUCCI et al., 2017). No entanto, no suco com 40% de polpa de araticum, o teor de fenólicos manteve-se estável e a viabilidade de *L. paracasei* aumentou ao final do armazenamento (28 dias). Portanto, é possível que com a fermentação tenham se formado compostos fenólicos menos tóxicos permitindo o crescimento de *L. paracasei* no suco com 40% de polpa de araticum. O alto percentual de fenólicos no suco com 40% de polpa de araticum pode ter dificultado a adaptação de *L. paracasei* no início do armazenamento.

Ao longo do tempo de armazenamento do suco de uva branca com adição de *Lactobacillus paracasei* ssp. (*L. casei*-01), não foi observado redução do pH ou aumento da acidez e assim, o suco apresentou redução significativa ($p < 0,05$) na quantidade de fenólicos totais entre o primeiro e vigésimo oitavo dia de armazenamento sob refrigeração. Os autores ressaltaram que culturas probióticas podem metabolizar os compostos fenólicos presentes nos sucos (OKINA et al., 2018). Tal constatação reforça a teoria de que a manutenção dos fenólicos do suco de araticum com LBC-81 foi devida a fermentação natural do suco pelo probiótico.

Já no suco de mirtilo adicionado de *L. plantarum* J26 que passou por processo de fermentação induzido e controlado, com redução de pH e aumento de acidez, constatou-se aumento do teor de fenólicos totais após a fermentação. Os autores atribuíram esse resultado, aos múltiplos fatores causados pelo metabolismo das bactérias do ácido láctico, dentre eles, a redução do pH causado pela multiplicação das bactérias. Essa diminuição afetaria a estrutura dos compostos fenólicos. Também, justificam que o polifenol macromolecular foi desintegrado em fenóis de moléculas pequenas por meio do metabolismo de desglicosilação realizado por algumas bactérias do ácido láctico (ZHANG et al., 2021).

No suco de laranja com adição de concentrado de células de *Lactobacillus rhamnosus* ATCC 53103 não se observou a ocorrência de fermentação e assim, constatou-se redução significativa de compostos fenólicos ao longo dos 28 dias de armazenamento sob refrigeração. Os autores atribuíram essa redução a fatores já esperados como a presença de oxigênio, altas temperaturas, exposição a luz e baixo pH (SENGUN et al., 2020).

5.4.2. Potencial antioxidante redutor do Fe (FRAP)

O teste de FRAP mede a capacidade dos antioxidantes da amostra de reduzirem o ferro férrico (Fe^{3+} = oxidado). O excesso de Fe^{3+} na mistura da reação é reduzido à forma ferrosa (reduzido = antioxidado), ao qual gera a formação de cor que está diretamente relacionada com a capacidade de redução da amostra.

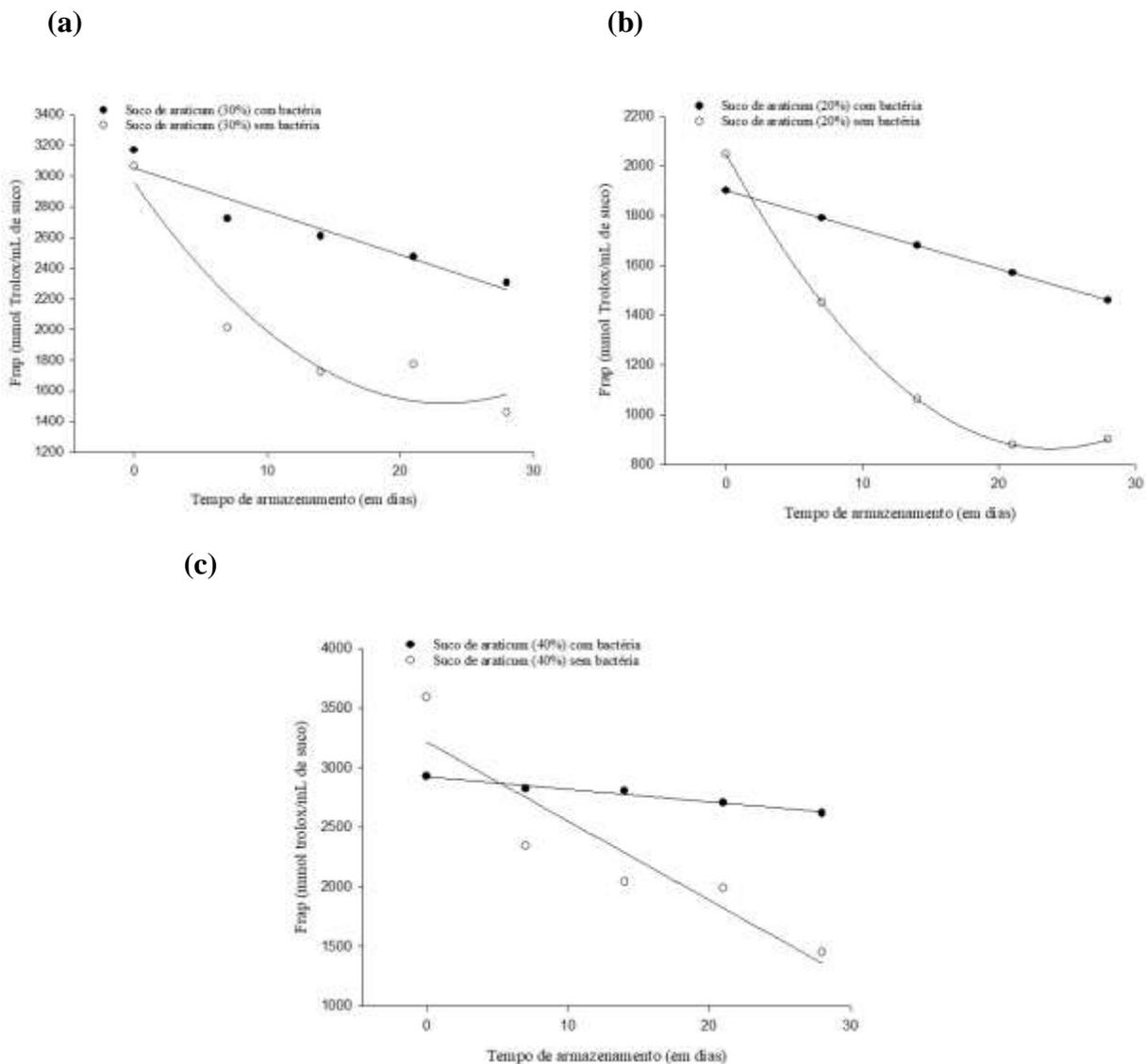


Figura 4. Atividade antioxidante, determinada pelo método FRAP, em suco de araticum com 20% de polpa (a), 30% de polpa (b) e 40% de polpa (c) com e sem adição de bactéria durante 28 dias de armazenamento a 4°C.

Nas formulações 1 e 2, observa-se que os sucos com probiótico apresentaram atividade antioxidante mais estável ao longo do armazenamento. Enquanto que a formulação 3 manteve-se estável tanto nos sucos contendo concentrado de células, quanto nos sucos sem o concentrado de células, segundo as equações lineares (Tabela 3). Os sucos sem concentrado de células probióticas, apresentaram tendência de queda mais acentuada ao longo dos 28 dias de armazenamento (Figura 4).

Ressalta-se também, que a atividade antioxidante pode estar relacionada aos antioxidantes presentes no araticum, uma vez que é possível observar maior atividade antioxidante a medida que as formulações possuem maior percentual de polpa, tanto nos sucos com, quanto nos sucos sem probiótico.

Resultado semelhante foi encontrado no suco de tomate fermentado por *Lactobacillus plantarum* e *Lactobacillus casei* que constatou aumento da atividade antioxidante após a fermentação pelo teste FRAP. Também observou redução do pH e aumento da viabilidade (LIU et al., 2018), o que reforça a hipótese de que a fermentação natural que ocorreu no suco de araticum com probiótico foi benéfica para o produto. O suco de jaca fermentado por *Lactobacillus casei* ATCC334 também verificou aumento significativo ($p < 0,05$) da atividade antioxidante após a fermentação, concluindo que esse processo foi benéfico, pois melhorou a atividade antimicrobiana e antioxidante e do perfil de metabólitos do suco de jaca (MUHIALDIN et al., 2021).

Vale ressaltar que as espécies reativas do oxigênio como O^2 e OH são, geralmente, associadas a efeitos negativos nas BAL's pois, podem alterar as proteínas, lipídios e ácidos nucleicos que as compõe, podendo ocasionar morte celular. Em contrapartida, algumas bactérias do grupo das BAL's possuem mecanismos de adaptação à toxicidade do oxigênio, como a prevenção da formação dessas espécies reativas ou eliminação (por degradação enzimática ou eliminação) ou reparação dos danos causados pelo oxigênio (KUIPERS et al., 2002).

5.4.3. Capacidade de eliminação de radicais livres (DPPH)

A capacidade de eliminação de radicais livres presentes no reagente DPPH dos sucos de araticum com e sem bactéria ao longo dos 28 dias de armazenamento é mostrada na Figura 5.

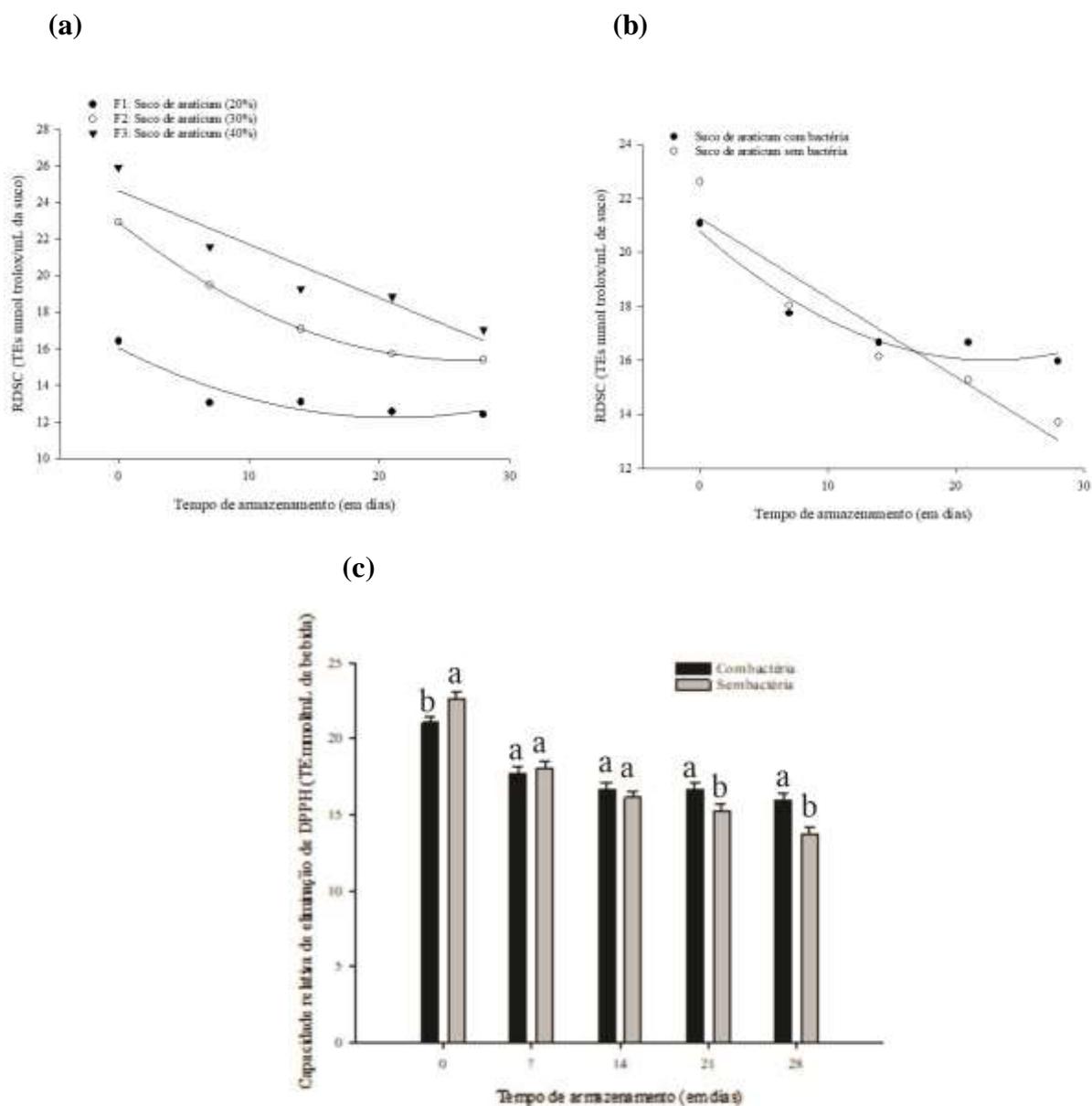


Figura 5. Atividade antioxidante, pelo método DPPH, em suco de araticum (20, 30 e 40% de polpa) (a) e atividade antioxidante do suco de araticum com e sem adição de bactéria durante 28 dias de armazenamento a 4°C (b) e atividade antioxidante nas bebidas com e sem bactéria antes do armazenamento e com 28 dias de armazenamento (c).

É possível observar uma tendência de redução da capacidade antioxidante dos sucos ao longo do tempo de armazenamento nas amostras contendo 20%, 30% e 40% de polpa (Figura 5a). Entretanto, a partir da Figura 5 b e 5 c, observa-se uma tendência de recuperação da capacidade antioxidante nos sucos com bactéria a partir do 14º dia de armazenamento.

Na Figura 5c, observa-se que no tempo 0, o poder antioxidante dos sucos sem *L. paracasei* é significativamente ($P < 0,05$) maior se comparado ao dos sucos com probiótico. A partir do 7º dia de armazenamento, o poder antioxidante dos sucos com e sem bactéria começa a não apresentar diferença significativa ($p > 0,05$), mantendo esse padrão nas análises realizadas no 14º dia. A partir do 21º dia de armazenamento, perdurando até o 28º dia, o grupo dos sucos com bactéria passa a ter o poder antioxidante superior ao do grupo dos sucos sem probiótico ($p < 0,05$). Assim como nos ensaios de compostos fenólicos totais e FRAP, tal resultado pode ser atribuído a fermentação natural ocorrida durante a estocagem sob refrigeração.

A atividade antioxidante dos sucos de araticum pode ser atribuída ao seu conteúdo fenólico total. A diminuição do teor de fenólicos é proporcional à redução da atividade antioxidante nos sucos, enquanto o aumento do teor de fenólicos nos sucos adicionados de bactérias também é proporcional ao aumento da atividade antioxidante dos sucos adicionados de bactérias.

O acúmulo de compostos fenólicos durante a fermentação é um dos principais motivos para maior capacidade antioxidante (WANG; ZHANG; LEI, 2022). Em suco de mirtilo fermentado por cepas probióticas (*Lactobacillus plantarum* e *Lactobacillus fermentum*), os autores observaram que o aumento de compostos flavonoides proporcionou aumento da capacidade antioxidante (LIAO et al., 2023). Além disso, dependendo da cepa probiótica, metabólitos com atividade antioxidante (glutathiona, ácido fólico, vitaminas, etc.) podem ser liberados no suco da fruta.

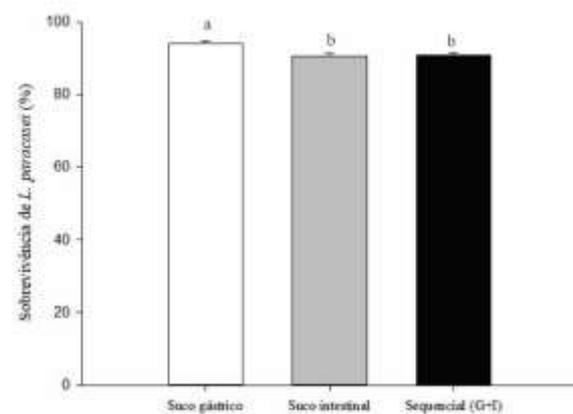
Outros autores observaram o aumento da capacidade antioxidante no teste de DPPH do suco de pera após a fermentação por *Lactobacillus* (*Lactiplantibacillus plantarum* 90, *Lactobacillus helveticus* 76 e *Lacticaseibacillus casei* 37) (WANG; ZHANG; LEI, 2022). O suco de limão doce fermentado por *Lactobacillus plantarum* LS apresentou redução do poder antioxidante ao longo do armazenamento por 28 dias sob refrigeração (HASHEMI et al., 2017).

Também é possível correlacionar o aumento da capacidade antioxidante das amostras com *L. paracasei* ao aumento dos compostos fenólicos (WANG; ZHANG; LEI, 2022) observados nos ensaios de compostos fenólicos totais realizado nas amostras de 40% de polpa com bactéria, que apresentou o mesmo comportamento de estabilização a partir do sétimo dia, seguido de aumento a partir do vigésimo primeiro dia de armazenamento.

5.5. Viabilidade e sobrevivência após o estresse gástrico, intestinal e sucessivo simulado

Os sucos contendo 20% (F1), 30% (F2) e 40% (F3) de polpa araticum com *L. paracasei* LBC-81 foram expostas às condições de estresse gastrointestinal *in vitro* e os resultados estão expressos na Figura 6.

- (a)
- (b)



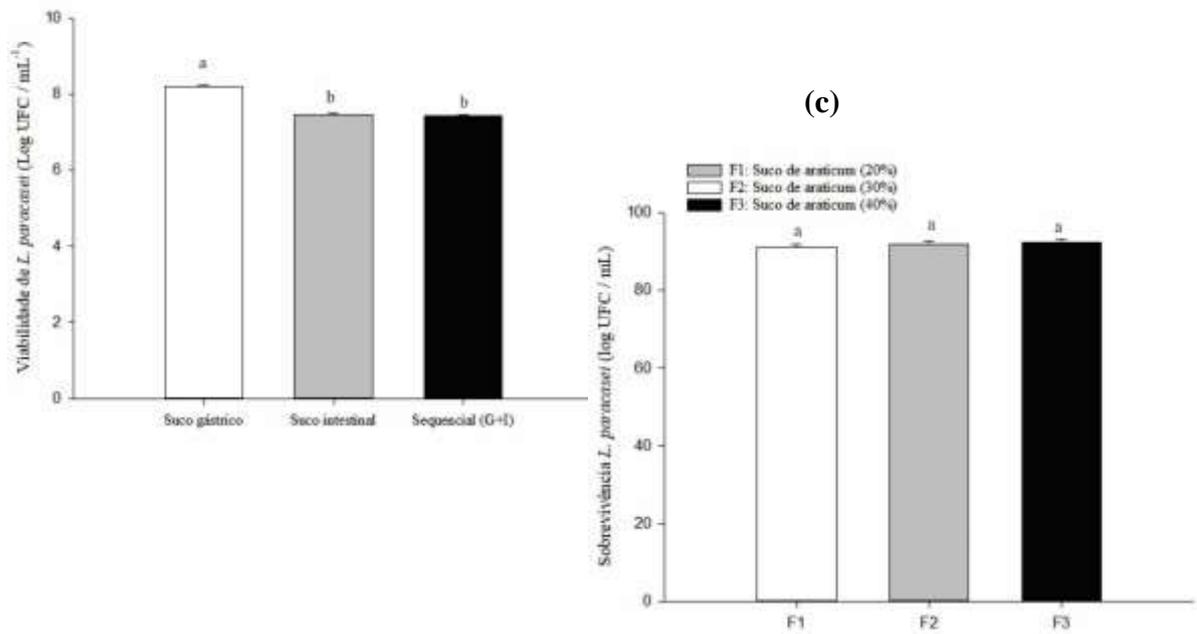


Figura 6. Viabilidade de *L. paracasei*, independente da formulação de suco de araticum, após exposição ao suco gástrico, intestinal e exposição sequencial ao suco gástrico e intestinal (a), sobrevivência de *L. paracasei*, independente da formulação de suco de araticum, após exposição ao suco gástrico, intestinal e exposição sequencial ao suco gástrico e intestinal (b) e sobrevivência de *L. paracasei*, independente da condição de exposição gastrointestinal, nas formulações de suco de araticum (c).

Todos os tratamentos permaneceram com valores alto de contagem de células probióticas após a exposição gastrointestinal simulada *in vitro*. Mostrando que o araticum é uma matriz viável para o consumo do probiótico.

Pelo teste de médias Tukey, (Figura 5a e 5b), observa-se que a viabilidade e sobrevivência de *L. paracasei* foi maior após a exposição ao suco gástrico. Tal condição foi a que causou menos danos celulares a cepa *L. paracasei* quando comparado à

exposição ao suco intestinal e ao estresse sucessivo mantendo a viabilidade acima de 8 log UFC / mL⁻¹ e a sobrevivência em torno de 94,03%.

Os autores acreditam que *L. paracasei* possa ter desenvolvido uma resposta adaptada devido à presença de ácidos orgânicos na polpa de araticum. Diferentes fatores podem estar relacionados à essa tolerância, dentre eles, o fato de o suco de araticum ser ácido, o que pode levar a diminuição da fluidez e a menor permeabilidade da membrana, impedindo o influxo de prótons nas células bacterianas durante à exposição ao suco gástrico, proporcionando proteção. (SRISUKCHAYAKUL; CHARALAMPOPOULOS; KARATZAS, 2018).

Resultado semelhante foi observado no suco de cranberry no qual *L. plantarum* NCIMB 8826 foi previamente adaptado ao meio ácido e teve a sua sobrevivência melhorada significativamente em comparação às células bacterianas não adaptadas previamente (CHAMPAGNE; GARDNER; ROY, 2005). Então, o *L. paracasei* pode ter realizado o seu ajuste ao meio através da acidez do suco de araticum e com isso, enfrentou melhor o novo estresse, o que seria um indicativo de que o suco de araticum poderia ser boa matriz para a bactéria.

Já os sucos de laranja, maçã e tomate, apesar de terem mantido a viabilidade de *Lactobacillus sanfranciscensis* dentro dos padrões recomendados (> 10⁶ log de UFC / mL) ao longo das 4 semanas de armazenamento a 4°C, não foram capazes de mantê-los adequados após a exposição às condições gastrointestinais simuladas *in vitro*. Os autores atribuíram esse resultado à ativação da pepsina presente no suco gástrico que pode destruir a ligação peptídica entre os aminoácidos da membrana degradando-a e além disso, verificou que a estirpe estudada não é tolerante a ácido, uma vez que tolerou o pH apenas até 5,5 (ZHU et al., 2020). Assim, pode-se observar que nem todas os *Lactobacillus* conseguem realizar os mecanismos de adaptação ao meio.

Quanto à exposição ao suco intestinal, observa-se através da Figura 6a e 6b maior redução da viabilidade e da sobrevivência se comparado ao estresse gástrico, com diferença significativa ($p < 0,05$). Nessa etapa a viabilidade reduziu para aproximadamente 7 log UFC / mL⁻¹ e a sobrevivência ficou em 90,49%. Em relação ao estresse sucessivo no qual o suco gástrico e o suco intestinal foram aplicados sucessivamente, é possível verificar que não houve diferença significativa em relação ao tratamento com o suco intestinal ($p > 0,05$), demonstrando viabilidade e sobrevivência semelhantes, mas que houve diferença significativa quando comparado ao tratamento com suco gástrico ($p < 0,05$).

Vale ressaltar que, a bile é uma secreção digestiva complexa que desempenha um papel na dispersão e absorção de gorduras e pode assim, prejudicar a membrana lipídica de bactérias por atuar como detergente. Entretanto, algumas bactérias do ácido láctico podem desenvolver mecanismos de resistência aos sais biliares e resistirem ao sistema digestivo. Um dos mecanismos é a hidrólise dos aminoácidos glicina e taurina presentes nos ácidos biliares pela enzima hidrolase de sais biliares que os *Lactobacillus* possuem. Desta forma, o poder detergente é reduzido. Outro mecanismo realizado pelas bactérias que pode ter ocorrido é a extrusão de sais biliares do meio interno, mediada pela família de transportadores de resistência multiQrug (MDR). Além disso, a enzima Glu descarboxilase é frequentemente encontrada em procariontes que colonizam ou passam pelo intestino. Foi proposto que esta enzima pode fortalecer as bactérias durante seu trânsito através do estômago (KUIPERS et al., 2002).

Por fim, na Figura 6c, observa-se o efeito da matriz nas condições gastrointestinais simuladas no que diz respeito a sobrevivência (contagem inicial e após o tratamento) e através dele, é possível observar que os diferentes percentuais de polpa não interferiram na sobrevivência do probiótico ($p > 0,05$). Mesmo com diferenças na acidez, na quantidade de compostos fenólicos ou na atividade antioxidante, não houve diferença na interferência da sobrevivência da bactéria. Este resultado é importante porque mostra que é possível preparar uma bebida probiótica de araticum mais concentrada.

O suco de cajá também demonstrou ser uma boa matriz para a viabilidade de *Lactobacillus acidophilus* NRRL B-4495 após a exposição gastrointestinal simulada no primeiro dia de armazenamento a 4 °C. No entanto, ao repetir o experimento aos 28 dias de armazenamento, a redução da viabilidade após exposição ao estresse entérico apresentou redução significativa. Com isso, pode-se supor que o estresse intestinal é mais prejudicial à bactéria se comparado ao gástrico, semelhante ao observado no presente estudo (RIBEIRO et al., 2020).

Probiótico inseridos em sucos às condições de trânsito gastrointestinal, autores propuseram a microencapsulação de *Lactobacillus plantarum* MTCC 1407 para serem inoculados em suco de pinha e desta forma. Tal processo formou grânulos de biopolímero com bactérias no seu interior de forma que suas paredes possuíam porosidade suficiente para a entrada do suco e a realização da fermentação, mas ao mesmo tempo, forneciam proteção a bactéria. Dessa forma, observaram maior

tolerância da estirpe quanto exposta aos sais biliares em comparação com as células bacterianas não encapsuladas (ARUNKUMAR et al., 2021).

6. CONCLUSÃO

O suco de araticum mostrou ser uma matriz carreadora viável para *Lactobacillus paracasei* subsp *paracasei* LBC-81, uma vez que apresentou contagem acima da recomendada para sua ingestão como alimento funcional probiótico (> 8 ciclos log UFC

/ mL) até o final do armazenamento de 28 dias. . Os três percentuais de polpa testados não interferiram na sobrevivência do probiótico. Contudo, a formulação contendo 40% de polpa de araticum parece ser a melhor dentre as três, pois apresentou viabilidade superior às demais.

Ademais, a adição do concentrado de bactérias altera de forma significativa o pH e acidez e demonstra a ocorrência de fermentação ocorrida naturalmente, mesmo em armazenamento à temperatura de 4°C, que não é a ideal para o crescimento de estirpe, o que reforça a boa adaptação de *L. paracasei* ao meio estudado.

Contudo, a adição do probiótico, devido a ocorrência dessa fermentação, aumentou a quantidade de compostos fenólicos e, conseqüentemente, a atividade antioxidante dos sucos se comparados aos que não tiveram a adição de *L. paracasei*. Assim, constatou-se a relação positiva entre a bactéria e tais propriedades benéficas à saúde do suco de araticum nas três concentrações de polpa. Ademais, o suco contendo 40% de polpa apresentou atividade antioxidante superior em relação as demais ao final do tempo de armazenamento.

Por fim, após a exposição ao estresse gastrointestinal simulado, o suco de araticum demonstrou ser uma matriz protetora ao probiótico, uma vez que as formulações permaneceram com contagem de *L. paracasei* após a exposição ao estresse gastrointestinal. Os diferentes percentuais de polpa não interferiram na sobrevivência após a exposição ao estresse gastrointestinal *in vitro*. E, a maior tolerância da bactéria foi observada quando exposta ao suco gástrico se comparada à exposição aos estresses intestinal e sucessivo.

Portanto, estudos futuros são necessários para avaliar se a produção de uma bebida totalmente não fermentada também apresentaria os benefícios observados no presente estudo. E, para que o suco não fermentasse, os autores sugerem o congelamento (produzindo-se sorvetes, picolés) com posterior avaliação do comportamento do probiótico na matriz submetida a baixas temperaturas. Outra alternativa para a não fermentação, seria microencapsular o *L. paracasei* para analisar os possíveis desfechos dessa condição.

Entretanto, ressalta-se que apesar de o objetivo inicial do presente estudo tenha sido o desenvolvimento de uma bebida não fermentada, a fim de atender ao paladar dos consumidores que não gostam do sabor proporcionado pela fermentação e pelo fato de *L. paracasei* subsp. *paracasei* LBC-81 fermentar com grande facilidade, observou-se que a leve fermentação ocorrida de forma natural ao longo do período de

armazenamento, trouxe benefícios relevantes às propriedades funcionais da bebida em questão. Além disso, os autores recomendam a análise sensorial nas pesquisas posteriores.

REFERÊNCIAS

AFZAAL, M. et al. Survival and stability of free and encapsulated probiotic bacteria under simulated gastrointestinal conditions and in pasteurized grape juice. **Journal of Food Processing and Preservation**, v. 44, n. 3, p. 1–8, 2020.

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. Resolução da diretoria colegiada RDC No 241, de 26 de Julho de 2018. **Diário Oficial da União**, v. 144, n. 1, p. 97, 2018.

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. Resolução da diretoria colegiada RDC No 242, de 26 de Julho de 2018. **Diário Oficial da União**, v. 144, n. 1, p. 97, 2018.

ALMEIDA, S.P.; SILVA, J.A.; RIBEIRO, J.F. Aproveitamento alimentar de espécies nativas dos cerrados: araticum, baru, cagaita e jatobá. Planaltina, DF, BR: EMBRAPA – CPAC. p 83, 1987.

AMERICAN PUBLIC HEALTH ASSOCIATION (APHA). SALFINGER, Y.; TORTORELLO, M. L. (Org.). Compendium of methods for the microbiological examination of foods. 5. Ed Whashgton, DC: APHA Press, 2015.

ANVISA. Alegações De Propriedades Funcionais. v. 1990, p. 1–12, 2019.

ANVISA. RDC nº 18 de 30 de abril de 1999. Aprova o Regulamento Técnico que estabelece as diretrizes básicas para análise e comprovação de propriedades funcionais e ou de saúde alegadas em rotulagem de alimentos, constante do anexo desta portaria. Diário Oficial da União - DOU, 1999.

ANVISA, A. N. DE V. S. Guia para instrução processual de petição de avaliação de probióticos para uso em alimentos. **Brasília (DF): Ministério da Saúde**, v. 21, n. 1, p. 1–58, 2021.

AOAC - ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS. Official Methods of Analysis of the AOAC. 18 th ed. Gaithersburg, M.D, USA. 2005.

AOCS - AMERICAN OIL CHEMISTS' SOCIETY. AOCS. Approved procedure am 5-04 rapid determination of oil/fat utilizing high temperature solvent extraction. 2005.

ARRUDA, H. S. et al. Determination of free, esterified, glycosylated and insoluble-bound phenolics composition in the edible part of araticum fruit (*Annona crassiflora* Mart.) and its by-products by HPLC-ESI-MS/MS. **Food Chemistry**, v. 245, n. November 2017, p. 738–749, 2018.

ARRUDA, H. S.; PASTORE, G. M. Araticum (*Annona crassiflora* Mart.) as a source of nutrients and bioactive compounds for food and non-food purposes: A comprehensive review. **Food Research International**, v. 123, n. March, p. 450–480, 2019.

ARRUDA, H. S.; PEREIRA, G. A.; PASTORE, G. M. Oligosaccharide profile in Brazilian Cerrado fruit araticum (*Annona crassiflora* Mart.). **Lwt**, v. 76, p. 278–283, 2017.

ARUNKUMAR, M. et al. Development of Improved Strategies for the Survival of *Lactobacillus plantarum* MTCC 1407 in Probioticated Custard Apple Juice.

Proceedings of the National Academy of Sciences India Section B - Biological Sciences, v. 91, n. 1, p. 217–226, 2021.

AYIVI, R. D. et al. Lactic Acid Bacteria: Food Safety and Human Health Applications. **Dairy**, v. 1, n. 3, p. 202–232, 2020.

BARBOSA, M. et al. Cholinesterase inhibitors assessment of aporphine alkaloids from *Annona crassiflora* and molecular docking studies. **Bioorganic Chemistry**, v. 120, n. January, 2022.

BARKER, A. K. et al. A randomized controlled trial of probiotics for *Clostridium difficile* infection in adults (PICO). **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 72, n. 11, p. 3177–3180, 2017

BEHERA, S. S.; PANDA, S. K. Ethnic and industrial probiotic foods and beverages: efficacy and acceptance. **Current Opinion in Food Science**, v. 32, p. 29–36, 2020.

BENSID, A. et al. Antioxidant and antimicrobial preservatives: Properties, mechanism of action and applications in food—a review. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 62, n. 11, p. 2985–3001, 2022.

BENZIE, I. F. F.; STRAIN, J. J. The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of “antioxidant power”: The FRAP assay. **Analytical Biochemistry**, v. 239, n. 1, p. 70–76, 1996.

BIOQUÍMICA, P. E. M. G. E.; BIOQUÍMICA, P. E. M. G. E. . Cássia Regina Silva UBERLÂNDIA - MG 2021. 2021.

BONTSIDIS, C. et al. Microbiological and chemical properties of chokeberry juice fermented by novel lactic acid bacteria with potential probiotic properties during fermentation at 4°C for 4 weeks. **Foods**, v. 10, n. 4, p. 1–16, 2021.

BRASIL. Catálogo de produtos da sociobiodiversidade do Brasil: ofertados pelos povos e comunidades tradicionais em Unidades de Conservação Federais. p. 102, 2019.

BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE. AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. Probióticos: construção da lista de linhagens probióticas. **Anvisa**, p. 1–14, 2017.

CALABUIG-JIMÉNEZ, L. et al. High pressures homogenization (HPH) to microencapsulate *L. salivarius* spp. *salivarius* in mandarin juice. Probiotic survival and *in vitro* digestion. **Journal of Food Engineering**, v. 240, n. July 2018, p. 43–48, 2019.

CARVALHO, N. C. C. et al. Phytochemical Analysis of the Fruit Pulp Extracts from *Annona crassiflora* Mart. and Evaluation of Their Antioxidant and Antiproliferative Activities. **Foods**, v. 11, n. 14, 2022.

CHAMPAGNE, C. P.; GARDNER, N. J.; ROY, D. Challenges in the addition of probiotic cultures to foods. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 45, n. 1, p. 61–84, 2005.

CHAN, M. Z. A.; TOH, M.; LIU, S. Q. Growth, survival, and metabolic activities of probiotic *Lactobacillus* spp. in fermented coffee brews supplemented with glucose and inactivated yeast derivatives. **Food Research International**, v. 137, n. April, p. 109746, 2020.

CHEN, C. et al. Role of lactic acid bacteria on the yogurt flavour: A review. **International Journal of Food Properties**, v. 20, n. 1, p. S316–S330, 2017.

CHENG, Z.; MOORE, J.; YU, L. High-throughput relative DPPH radical scavenging capacity assay. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 54, n. 20, p. 7429–7436, 2006.

CRISTINY DE OLIVEIRA VIEIRA, K. et al. Development and viability of probiotic orange juice supplemented by *Pediococcus acidilactici* CE51. **Lwt**, v. 130, n. May, p. 109637, 2020.

DE AGUIAR, A. O. et al. Use of Passion Fruit's Albedo as a Source of Pectin to Produce Araticum (*Annona crassiflora* Mart.) Preserves. **Chemical Engineering Transactions**, v. 75, n. September, p. 223–228, 2019.

DE LIMA, A. V. S. C. et al. Characterization and sensory preference of fermented dairy beverages prepared with different concentrations of whey and araticum pulp. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 37, n. 6, p. 4011–4026, 2016.

DE MEDEIROS, J. C. et al. Survival of *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei* LBC 81 in cottage cheese supplemented with green banana, oat, or chickpea flours during refrigerated storage. **Journal of Food Processing and Preservation**, v. 44, n. 10, p. 0–3, 2020.

DE MORAIS C. L.; DA SILVA O. D.; DE FREITAS B. S.; DUARTE, M. H. S.; PINHEIRO-SANT'ANA, H.M. Araticum (*Annona crassiflora* Mart.) from the Brazilian Cerrado: Chemical composition and bioactive compounds. **Fruits**, v. 68 n.2, 2013.

DE OLIVEIRA, P. M. et al. Mango and carrot mixed juice: a new matrix for the vehicle of probiotic lactobacilli. **Journal of Food Science and Technology**, v. 58, n. 1, p. 98–109, 2021.

DOMÍNGUEZ DÍAZ, L.; FERNÁNDEZ-RUIZ, V.; CÁMARA, M. The frontier between nutrition and pharma: The international regulatory framework of functional foods, food supplements and nutraceuticals. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 60, n. 10, p. 1738–1746, 2020.

EZEKIEL, O. O.; OJUOLA, O. F.; ADEDEJI, O. E. Stability of encapsulated. **Acta Periodica Technologica**, v. 51, p. 61–75, 2020.

FAO - FOOD AND AGRICULTURAL ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS. Joint FAO Report on Functional Foods. Available from www.fao.org. Accessed on November 01, 2021, 2007.

FAO/WHO - WORLD HEALTH ORGANIZATION. Joint FAO/WHO food standards programme codex committee on nutrition and foods for special dietary uses: discussion paper on harmonized probiotic guidelines for use in foods and dietary supplements. **Codex Alimentarius Commission**, n. november 2018, p. 17, 2018.

FONSCECA, H.C.; MELO, D. de S.; RAMOS, C.L.; DIAS, D.R.; SCHWAN, R.F. *Lactiplantibacillus plantarum* CCMA 0743 and *Lacticaseibacillus paracasei* subsp. *paracasei* LBC-81 metabolism during the single and mixed fermentation of tropical fruit juices. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 52 n. 4, p. 2307–2317, 2021.

GHEIHMAN, N. Veganism as a lifestyle movement. **Sociology Compass**, v. 15, n. 5, p. 1–14, 2021.

GOH, Y. J.; BARRANGOU, R. Portable CRISPR-Cas9 N System for Flexible Genome Engineering. **Aem**, v. 87, n. 6, p. 1–16, 2021.

GUAN, NINGZI; LIU, L. Microbial response to acid stress: mechanisms and applications. p. 51–65, 2020.

GUL, K.; SINGH, A. K.; JABEEN, R. Nutraceuticals and Functional Foods: The Foods for the Future World. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 56, n. 16, p. 2617–2627, 2016.

GUMUS, S.; DEMIRCI, A. S. Survivability of probiotic strains, *Lactobacillus fermentum* CECT 5716 and *Lactobacillus acidophilus* DSM 20079 in grape juice and physico-chemical properties of the juice during refrigerated storage. **Food Science and Technology (Brazil)**, v. 42, p. 1–7, 2022.

HASHEMI, S. M. B. et al. Fermented sweet lemon juice (*Citrus limetta*) using *Lactobacillus plantarum* LS5: Chemical composition, antioxidant and antibacterial activities. **Journal of Functional Foods**, v. 38, p. 409–414, 2017.

HILL, D. et al. The *Lactobacillus casei* group: History and health related applications. **Frontiers in Microbiology**, v. 9, n. SEP, p. 1–12, 2018.

JAYARATHNA, S. et al. Probiotic enriched fermented soy-gel as a vegan substitute for dairy yoghurt. **Journal of Food Processing and Preservation**, v. 45, n. 1, 2021.

KIM, Y. A. et al. Mitochondria-mediated apoptosis by diallyl trisulfide in human prostate cancer cells is associated with generation of reactive oxygen species and regulated by Bax/Bak. **Molecular Cancer Therapeutics**, v. 6, n. 5, p. 1599–1609,

2007.

KUIPERS, O. P. et al. **Transcriptome analysis and related databases of *Lactococcus lactis***. [s.l.: s.n.].

LIAO, W. et al. Investigation of blueberry juice fermentation by mixed probiotic strains: Regression modeling, machine learning optimization and comparison with fermentation by single strain in the phenolic and volatile profiles. **Food Chemistry**, v. 405, n. PB, p. 134982, 2023.

LIU, Y. et al. Beneficial effects of tomato juice fermented by *Lactobacillus plantarum* and *Lactobacillus casei*: Antioxidation, antimicrobial effect, and volatile profiles. **Molecules**, v. 23, n. 9, p. 1–18, 2018.

MACHADO, A. R. T. et al. Nematicidal activity of *Annona crassiflora* leaf extract on *Caenorhabditis elegans*. **Parasites and Vectors**, v. 8, n. 1, p. 4–8, 2015.

MANTZOURANI, I. et al. Production of a novel functional fruit beverage consisting of cornelian cherry juice and probiotic bacteria. **Antioxidants**, v. 7, n. 11, 2018.

MANTZOURANI, I. et al. Valorization of Lactic Acid Fermentation of Pomegranate Juice by an Acid Tolerant and Potentially Probiotic LAB Isolated from Kefir Grains. **Fermentation**, v. 8, n. 4, 2022.

MAURYA, A. P. et al. Nutraceuticals and their impact on human health. [s.l.] Elsevier **Inc.**, 2021.

MESQUITA, M. C. et al. Fermentation of chickpea (*Cicer arietinum L.*) and coconut (*Coccus nucifera L.*) beverages by *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei* LBC 81: The influence of sugar content on growth and stability during storage. **Lwt**, v. 132, 2020.

MESQUITA, M. C. et al. Survival of *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei* LBC 81 in Fermented Beverage from Chickpeas and Coconut in a Static *in vitro* Digestion Model. **Fermentation**, v. 7, n. 3, p. 135, 2021.

METE, R. et al. What is healthy eating? A qualitative exploration. **Public Health Nutrition**, v. 22, n. 13, p. 2408–2418, 2019.

MILLET, M. et al. Haze in Apple-Based Beverages: Detailed Polyphenol, Polysaccharide, Protein, and Mineral Compositions. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 65, n. 31, p. 6404–6414, 2017.

MINISTÉRIO DA SAÚDE; AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA, Instrução normativa IN N° 76, de 5 de novembro de 2020. **Diário Oficial da União**, n.215, 2020.

MORADI, M.; MOLAEI, R.; GUIMARÃES, J. T. A review on preparation and

chemical analysis of postbiotics from lactic acid bacteria. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 143, n. November 2020, 2021.

MUHIKALDIN, B. J. et al. Metabolomic changes and biological activities during the lacto-fermentation of jackfruit juice using *Lactobacillus casei* ATCC334. **Lwt**, v. 141, n. January, p. 110940, 2021.

NEFFE-SKOCIŃSKA, K. ET AL. Trends and Possibilities of the use of probiotics in food production. **Alternative and Replacement Foods**, v. 17, n. 4, p. 65–94, 2018.

NGUYEN, B. T. et al. Probiotic beverage from pineapple juice fermented with *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* strains. **Frontiers in Nutrition**, v. 6, n. May, p. 1–7, 2019.

OKINA, V. S. et al. White grape juice added with *Lactobacillus paracasei* ssp. probiotic culture. **Nutrition and Food Science**, v. 48, n. 4, p. 631–641, 2018.

PATTERSON, E. et al. *Lacticaseibacillus paracasei* Lpc-37® improves psychological and physiological markers of stress and anxiety in healthy adults: a randomized, double-blind, placebo-controlled and parallel clinical trial (the Sisu study). **Neurobiology of Stress**, v. 13, 2020.

PATTHAMAKANOKPORN, O. et al. Changes of antioxidant activity and total phenolic compounds during storage of selected fruits. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 21, n. 3, p. 241–248, 2008.

PENG, W. et al. Effect of the apple cultivar on cloudy apple juice fermented by a mixture of *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus plantarum*, and *Lactobacillus fermentum*. **Food Chemistry**, v. 340, n. July 2020, p. 127922, 2021.

PIMENTA, L. P. S. et al. *In vivo* antimalarial efficacy of acetogenins, alkaloids and flavonoids enriched fractions from *Annona crassiflora* Mart. **Natural Product Research**, v. 28, n. 16, p. 1254–1259, 2014.

PIMENTEL, T. C. et al. Probiotic viability, physicochemical characteristics and acceptability during refrigerated storage of clarified apple juice supplemented with *Lactobacillus paracasei* ssp. paracasei and oligofructose in different package type. **Lwt**, v. 63, n. 1, p. 415–422, 2015.

PIMENTEL, T. C. et al. Vegan probiotic products: A modern tendency or the newest challenge in functional foods. **Food Research International**, v. 140, n. December 2020, 2021.

PLASEK, B. et al. Consumer evaluation of the role of functional food products in disease prevention and the characteristics of target groups. **Nutrients**, v. 12, n. 1, 2020.

PORZI, M. et al. Development of Personalized Nutrition: Applications in Lactose Intolerance Diagnosis and Management. **Nutrients**, v. 13, n. 5, p. 1–22, 2021.

PRADO, L. G. et al. Antioxidant, antiproliferative and healing properties of araticum (*Annona crassiflora* Mart.) peel and seed. **Food Research International**, v. 133, n. March, p. 109168, 2020.

QUINTANILHA, B. J. et al. Nutrимиomics: Role of micromnas and nutrition in modulating inflammation and chronic diseases. **Nutrients**, v. 9, n. 11, p. 1–24, 2017.

RAMAN, J. et al. Application of Lactic Acid Bacteria (LAB) in Sustainable Agriculture: Advantages and Limitations. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 23, n. 14, 2022.

RAMOS, A. L. C. C. et al. Use of pulp, peel, and seed of *Annona crassiflora* Mart. in elaborating extracts for fingerprint analysis using paper spray mass spectrometry. **Food Research International**, v. 160, n. July, 2022.

RIBEIRO, E. S. S. et al. Fermented yellow mombin juice using *Lactobacillus acidophilus* NRRL B-4495: Chemical composition, bioactive properties and survival in simulated gastrointestinal conditions. **PLoS ONE**, v. 15, n. 9 September, p. 1–17, 2020.

RUIZ RODRÍGUEZ, L. G. et al. Fruits and fruit by-products as sources of bioactive compounds. Benefits and trends of lactic acid fermentation in the development of novel fruit-based functional beverages. **Food Research International**, v. 140, p. 109854, 2021.

SANTOS, M. C. M. DOS. Bebida de grão-de-bico e coco fermentada por *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei* LBC 81 elaborada com diferentes teores de açúcar. Universidade de Brasília, 2020.

SENGUN, I. Y. et al. The viability of *Lactobacillus rhamnosus* in orange juice fortified with nettle (*Urtica dioica* L.) and bioactive properties of the juice during storage. **Lwt**, v. 118, n. September 2019, p. 108707, 2020.

SHAH, N.P. Functional foods from probiotics and prebiotics. **Food Technology**, V. 55, p. 46–53, 2001.

SHAHIDI, F. Nutraceuticals and functional foods: Whole versus processed foods. **Trends in Food Science and Technology**, v. 20, n. 9, p. 376–387, 2009.

SHORI, A. B. Influence of food matrix on the viability of probiotic bacteria: A review based on dairy and non-dairy beverages. **Food Bioscience**, v. 13, p. 1–8, 2016.

SILVA, M. R. et al. Caracterização química de frutos nativos do cerrado. **Ciência Rural**, v. 38, n. 6, p. 1790–1793, 2008.

SOARES, M. B. et al. The resistance of *Bacillus*, *Bifidobacterium*, and *Lactobacillus* strains with claimed probiotic properties in different food matrices exposed to simulated gastrointestinal tract conditions. **Food Research International**, v. 125, n. February, p. 108542, 2019.

SRISUKCHAYAKUL, P.; CHARALAMPOPOULOS, D.; KARATZAS, K. A. Study on the effect of citric acid adaptation toward the subsequent survival of *Lactobacillus plantarum* NCIMB 8826 in low pH fruit juices during refrigerated storage. **Food Research International**, v. 111, n. February, p. 198–204, 2018.

SUCCI, M. et al. Survival of commercial probiotic strains in dark chocolate with high cocoa and phenols content during the storage and in a static in vitro digestion model. **Journal of Functional Foods**, v. 35, p. 60–67, 2017.

TAYO, B. A.; AKPEJI, S. Probiotic viability, physicochemical and sensory properties of probiotic pineapple juice. **Fermentation**, v. 2, n. 4, 2016.

TURKMEN, N.; AKAL, C.; ÖZER, B. Probiotic dairy-based beverages: A review. **Journal of Functional Foods**, v. 53, n. December 2018, p. 62–75, 2019.

VALENCIA, M. S. et al. Development of creamy milk chocolate dessert added with fructo-oligosaccharide and *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei* LBC 81. **LWT - Food Science and Technology**, v. 69, p. 104–109, 2016.

VAN DE GUCHTE, M. et al. Stress responses in lactic acid bacteria. **Antonie van Leeuwenhoek, International Journal of General and Molecular Microbiology**, v. 82, n. 1–4, p. 187–216, 2002.

VERRUCK, S.; PRUDENCIO, E. S. Survival of *Bifidobacterium* ssp. during gastrointestinal passage and their mechanism of action for pathogenic bacteria inhibition in the gut: a concise review. **Food Biology**, v. 8, p. 01–06, 2019.

VIEIRA, A. D. S. et al. Impact of Acerola (*Malpighia emarginata* DC) Byproduct and Probiotic Strains on Technological and Sensory Features of Fermented Soy Beverages. **Journal of Food Science**, v. 84, n. 12, p. 3726–3734, 2019.

VIJAYA KUMAR, B.; VIJAYENDRA, S. V. N.; REDDY, O. V. S. Trends in dairy and non-dairy probiotic products - a review. **Journal of Food Science and Technology**, v. 52, n. 10, p. 6112–6124, 2015.

VILAR, J. B. et al. Assessment of the mutagenic, antimutagenic and cytotoxic activities of ethanolic extract of araticum (*Annona crassiflora* Mart. 1841) by micronucleus test in mice. **Brazilian Journal of Biology**, v. 68, n. 1, p. 141–147, 2008.

VOGADO, C. DE O. et al. Enrichment of probiotic fermented milk with green banana pulp: Characterization microbiological, physicochemical and sensory. **Nutrients**, v. 10, n. 4, 2018.

WANG, C.; CUI, Y.; QU, X. Mechanisms and improvement of acid resistance in lactic acid bacteria. **Archives of Microbiology**, v. 200, n. 2, p. 195–201, 2018.

WANG, L.; ZHANG, H.; LEI, H. Phenolics profile, antioxidant activity and flavor

volatiles of pear juice: influence of lactic acid fermentation using three *Lactobacillus* strains in monoculture and binary mixture. **Foods**, v. 11, n. 1, 2022.

YE, Q.; GEORGES, N.; SELOMULYA, C. Microencapsulation of active ingredients in functional foods: From research stage to commercial food products. **Trends in Food Science and Technology**, v. 78, n. January, p. 167–179, 2018.

ZHANG, Y. et al. Enhancement of functional characteristics of blueberry juice fermented by *Lactobacillus plantarum*. **Lwt**, v. 139, n. May 2020, p. 110590, 2021.

ZHENG, J. et al. A taxonomic note on the genus *Lactobacillus*: Description of 23 novel genera, emended description of the genus *Lactobacillus beijerinck* 1901, and union of *Lactobacillaceae* and *Leuconostocaceae*. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 70, n. 4, p. 2782–2858, 2020.

ZHAO, D.; SHAH, N. P. Effect of tea extract on lactic acid bacterial growth, their cell surface characteristics and isoflavone bioconversion during soymilk fermentation. **Food Research International**, v. 62, p. 877–885, 2014.

ZHU, W. et al. Functional efficacy of probiotic *Lactobacillus sanfranciscensis* in apple, orange and tomato juices with special reference to storage stability and *in vitro* gastrointestinal survival. **Beverages**, v. 6, n. 1, p. 1–9, 2020.