



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE BIOCIÊNCIAS
DEPARTAMENTO DE ANTIBIÓTICOS
PROGRAMA DE DOUTORADO EM BIOTECNOLOGIA RENORBIO

ELOYZA KAROLINE ROZENDO DOS SANTOS

**EFEITO DO ESTRESSE ÁCIDO SOBRE *Lactobacillus rhamnosus* ATCC 7469
NA PRODUÇÃO DE SUCOS SIMBIÓTICOS CONTENDO INULINA E XILITOL**

Recife - PE

2021

ELOYZA KAROLINE ROZENDO DOS SANTOS

**EFEITO DO ESTRESSE ÁCIDO SOBRE *Lactobacillus rhamnosus* ATCC 7469
NA PRODUÇÃO DE SUCOS SIMBIÓTICOS CONTENDO INULINA E XILITOL**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia - RENORBIO da Universidade Federal de Pernambuco, como requisito parcial para obtenção do título de doutor em Biotecnologia.

Área de Concentração: Biotecnologia Industrial
Orientadora: Prof.^a Dra. Ester Ribeiro de Andrade
Coorientadora: Prof.^a Dra. Christine Lamenha Luna Finkler

Recife

2021

Catálogo na Fonte:
Bibliotecário Bruno Márcio Gouveia, CRB-4/1788

Santos, Eloyza Karoline Rozendo dos
Efeito do stresse ácido sobre *Lactobacillus rhamnosus* ATCC 7469 na produção de
sucos simbióticos contendo inulina e xilitol / Eloyza Karoline Rozendo dos Santos. - 2021.

118 f. : il.

Orientadora: Profa. Dra. Ester Ribeiro de Andrade.

Coorientadora: Profa. Dra. Christine Lamenha Luna Finkler.

Tese (doutorado) – Universidade Federal de Pernambuco. Centro de
Biotecnologia. Programa de Pós-graduação Programa de Pós-Graduação
em Biotecnologia - RENORBIO, Recife, 2021.

Inclui referências e apêndices.

1. Indústria alimentícia. 2. Alimento funcional. 3. Frutas tropicais. I.
Andrade, Ester Ribeiro de (orientadora). II. Finkler, Christine Lamenha
Luna (coorientadora). III. Título.

641

CDD (22.ed.)

UFPE/CB-2021-198

ELOYZA KAROLINE ROZENDO DOS SANTOS

**EFEITO DO ESTRESSE ÁCIDO SOBRE *Lactobacillus rhamnosus* ATCC 7469
NA PRODUÇÃO DE SUCOS SIMBIÓTICOS CONTENDO INULINA E XILITOL**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia (RENORBIO), da Universidade Federal de Pernambuco, como requisito para obtenção do título de Doutora em Biotecnologia.

Área de Concentração:
Biotecnologia Industrial

Aprovada em: 30 de março de 2021.

COMISSÃO EXAMINADORA

Prof^a Dra. Norma Buarque de Gusmão
Universidade Federal de Pernambuco

Prof.^a Dra. Gláucia Manoella de Souza Lima
Universidade Federal de Pernambuco

Prof.^a Dra. Thayza Christina Montenegro Stamford
Universidade Federal de Pernambuco

Prof.^a Dra. Tatiana Souza Porto
Universidade Federal Rural de Pernambuco

Prof^a Dra. Ester Ribeiro de Andrade
Universidade Federal de Pernambuco

*Dedico este trabalho à minha família que caminhou comigo nesta incrível jornada,
em especial ao meu amado esposo Jonathan que, pacientemente, me apoiou e
encorajou em todos os momentos.*

AGRADECIMENTOS

O sentimento de gratidão nos faz perceber o quanto cada acontecimento vivido foi importante para nosso desenvolvimento. Sendo assim, agradeço primeiramente a Deus pelos pais que me concedeu, pois nunca limitaram os meus sonhos.

Ao meu esposo, que em momento algum me deixou desistir. Poder contar com sua parceria faz de mim uma mulher abençoada. Obrigada por estar ao meu lado, seus conselhos me ajudaram a seguir.

Aos professores que fizeram parte da minha formação, em especial à minha orientadora, Ester Ribeiro. Sua dedicação aos alunos, sempre prestativa e disciplinada, fazem da senhora um exemplo a ser seguido.

À minha coorientadora Christine Lamenha, pelos valiosos conselhos e por sua generosidade.

Às pessoas que passaram ou que ainda estão em minha vida, pois de certa forma me impulsionaram até aqui. Obrigada Inácio Domingos, Ana Fraga, Edilma Santos, Ailton Sena, Zilmar Pimenta, Walkeane Carneiro, Iranildo José e Ricardo Marchezan. O apoio de vocês foi essencial nessa caminhada.

Ao programa de Pós-Graduação RENORBIO, à UFPE e à FACEPE. Instituições que tornaram essa pesquisa possível.

Aos integrantes da banca avaliadora. Ao compartilharem seus conhecimentos, auxiliaram na construção deste trabalho, assim como impulsionaram meu desenvolvimento intelectual.

Por fim, mas não menos importante, à população brasileira que, por meio dos encargos pagos, me concedeu uma formação pública e de excelência.

“O importante é não parar de questionar; a curiosidade tem sua própria razão de existir.”

Albert Einstein

RESUMO

A demanda por alimentos funcionais tem crescido nos últimos anos. Nesse contexto, novas formulações probióticas não lácteas tem atraído o interesse dos consumidores. Sendo assim, estratégias que ampliem a sobrevivência probiótica ao período de processamento, estocagem e após ingestão de novos produtos têm sido alvo de investigações. Com base nisso, o objetivo do presente trabalho foi produzir sucos probióticos e fermentados de manga, maracujá e goiaba, avaliando o estresse ácido durante a fermentação e a adição de inulina e xilitol nos sucos potencialmente simbióticos em estoque refrigerado. Para isso, investigou-se a capacidade do probiótico em fermentar sucos das três frutas, assim como o seu perfil metabólico quando submetido a estresse ácido. As duas melhores condições, considerando a sobrevivência microbiana, foram selecionadas para a elaboração dos sucos fermentados. A influência da adição de inulina (5 g/L) e xilitol (10%) aos sucos após fermentação, contendo *L. rhamnosus*, foi investigada durante 60 dias de estoque refrigerado (4 °C). Durante todo o período de estudo, a viabilidade (Log UFC/mL), o pH, a produção de ácido lático, o consumo de carboidratos e a sobrevivência (S (%)) celular ao teste de simulação das condições gastrointestinais (TSGI) foram acompanhados. As condições em que *L. rhamnosus* deteve melhor desempenho quando submetido ao TSGI foram nas fermentações do suco de manga sem estresse ácido (S (%) = 44,6) e após transferência sucessiva do micro-organismo do pH 6, para o pH 4 e consecutivamente para o pH 2 em meio à base de maracujá (S (%) = 47,3). Sendo assim, estes grupos foram selecionados para elaboração dos sucos com ou sem inulina e/ou xilitol e avaliação da estabilidade em estoque refrigerado. Dessa forma, observou-se que a adição de inulina favoreceu a sobrevivência probiótica. No que lhe concerne, a presença do xilitol não prejudicou o desempenho de *L. rhamnosus*, podendo assim ser utilizado como agente edulcorante em formulações contendo esse micro-organismo. O suco fermentado de manga acrescido de inulina e xilitol foi o que apresentou maior potencial para ser utilizado como veículo de *L. rhamnosus* ATCC 7469 devido à sobrevivência do probiótico ao TSGI no início (S (%) = 33,8) e após 15 dias (S (%) = 52,5) de estoque refrigerado.

Palavras-chave: Suco funcional. Alimento simbiótico não lácteo. Frutas topicais. Resistência gastrointestinal.

ABSTRACT

The demand for functional foods has grown in recent years. In this context, new non-dairy probiotic formulations have attracted the interest of consumers. Thus, strategies that increase probiotic survival during the processing, storage and after ingestion of new products have been the target of investigations. Based on this, the objective of the present work was to produce probiotic juices fermented from mango, passion fruit and guava, evaluating acid stress during fermentation and the addition of inulin and xylitol in potentially symbiotic juices in refrigerated stock. For this, the ability of the probiotic to ferment juices of the three fruits was investigated, as well as its metabolic profile when submitted to acid stress. The two best conditions, considering the microbial survival, were selected for the elaboration of the fermented juices. The influence of the addition of inulin (5 g/L) and xylitol (10%) to juices after fermentation, containing *L. rhamnosus*, was investigated during 60 days of refrigerated storage (4 °C). During the study, viability (Log CFU/mL), pH, lactic acid production, carbohydrate consumption and cell survival (S (%)) to the gastrointestinal conditions simulation test (GIST) were monitored. The conditions in which *L. rhamnosus* had the best performance when subjected to GIST were in mango juice fermentations without acid stress (S (%) = 44.6) and after successive transfer of the microorganism from pH 6 to pH 4 and consecutively to pH 2 in passion fruit medium (S (%) = 47.3). Therefore, these groups were selected for the elaboration of juices with or without inulin and/or xylitol and evaluation of stability in refrigerated stock. Thus, it was observed that the addition of inulin favored probiotic survival. In turn, the presence of xylitol does not affect the performance of *L. rhamnosus*, and can thus be used as a sweetening agent in formulations containing this microorganism. Fermented mango juice added with inulin and xylitol had the greatest potential to be used as a vehicle for *L. rhamnosus* ATCC 7469 due to the survival of the probiotic to GIST at the beginning (S (%) = 33.8) and after 15 days (S (%) = 52.5) of refrigerated stock.

Keywords: Functional juice. Symbiotic non-dairy food. Tropical fruits. Gastrointestinal resistance.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Processo para a seleção em gradiente ácido total (A) e reduzido (B) de <i>Lactobacillus rhamnosus</i> ATCC 7469. A seleção parcial (C) foi considerada apenas nos casos em que o probiótico não se manteve viável no pH 2.	41
Figura 2 – Esquema do Teste de Simulação das Condições Gastrointestinais (TSGI). Viabilidade inicial (Vi); viabilidade final (Vf).	45
Figura 3 – Viabilidade de <i>L. rhamnosus</i> durante as fermentações no meio padrão (MRS) e nos meios de cultura à base de polpa com pH inicial 6.	48
Figura 4 – Concentração de glicose nas fermentações realizadas por <i>L. rhamnosus</i> em meio padrão e nos meios à base de polpa com pH inicial 6.	50
Figura 5 – Concentração de frutose nas fermentações realizadas por <i>L. rhamnosus</i> nos meios à base de polpa com pH inicial 6.	51
Figura 6 – Valores para o pH durante as fermentações realizadas por <i>L. rhamnosus</i> no meio padrão e nos meios à base de polpa com pH inicial 6.	53
Figura 7 – Concentração do ácido láctico durante as fermentações realizadas por <i>L. rhamnosus</i> no meio padrão e nos meios à base de polpa com pH inicial 6.	54
Figura 8 – Viabilidades celulares inicial e final e sobrevivência do <i>L. rhamnosus</i> ATCC 7469 em condições gastrointestinais simuladas. Diferentes letras minúsculas indicam que os valores diferem significativamente ($\alpha \leq 0.05$) para a polpa; diferentes letras maiúsculas indicam que os valores diferem significativamente ($\alpha \leq 0.05$) entre as polpas.	55
Figura 9 – Curva de crescimento do <i>Lactobacillus rhamnosus</i> durante fermentações em meio MRS com diminuição sucessiva do pH.	58
Figura 10 – Viabilidade do <i>L. rhamnosus</i> e consumo de glicose durante as fermentações do meio MRS com pH ajustado para 4. A sigla MRS4 corresponde ao meio com pH inicial 4.	59
Figura 11 – Concentração de ácido láctico e pH durante as fermentações do meio MRS com pH ajustado para 4. A sigla MRS4 corresponde ao meio com pH inicial 4.	60
Figura 12 – Viabilidade, concentração de glicose e de frutose e pH durante as fermentações em meio do suco de manga para a pH 4 (A), com pH inicial igual 2 durante seleção total (B) e com pH inicial igual 2 durante seleção reduzida (C).	64

Figura 13 – Viabilidade, concentração de glicose e de frutose e pH durante as fermentações em meio do suco de goiaba para a pH 4 (A), com pH inicial igual 2 durante seleção total (B) e com pH inicial igual 2 durante seleção reduzida (C).	67
Figura 14 – Viabilidade, concentração de glicose e de frutose e pH durante as fermentações em meio do suco de maracujá para a pH 4 (A), com pH inicial igual 2 durante seleção total (B) e com pH inicial igual 2 durante seleção reduzida (C).	71
Figura 15 – Sobrevivência em porcentagem de <i>L. rhamnosus</i> ATCC 7469 nos meios de manga, maracujá e goiaba em pH 2 para seleção total (pH2t) e seleção reduzida (pH2r) após as 12h de cultivo.	73
Figura 16 – Sobrevivência de <i>L. rhamnosus</i> ATCC 7469 ao teste de simulação das condições gastrointestinais após serem submetidas a seleção total (pH2t) e reduzida (pH2r). O grupo controle foi cultivado em pH 6. Diferentes letras minúsculas indicam que os valores diferem significativamente ($\alpha \leq 0.05$) para a polpa; diferentes letras maiúsculas indicam que os valores diferem significativamente ($\alpha \leq 0.05$) entre as polpas.	75
Figura 17 – Viabilidade (A) e Sobrevivência (B) de <i>L. rhamnosus</i> nos sucos controle (SC), com inulina (SI), com xilitol (SX) e com inulina e xilitol (SIX) à base de polpa de manga durante estoque refrigerado	78
Figura 18 – Valores dos pHs para os sucos controle (SC), com inulina (SI), com xilitol (SX) e com inulina e xilitol (SIX) à base de polpa de manga durante estoque refrigerado.	82
Figura 19 – Valores obtidos no início do estoque refrigerado do °Brix para o suco controle (SC), suco com inulina (SI), suco com xilitol (SX) e suco com inulina e xilitol (SIX) à base de polpa de manga. Diferentes letras maiúsculas indicam que os valores diferem significativamente ($\alpha \leq 0.05$) entre as bebidas.....	85
Figura 20 – Viabilidade (A) e Sobrevivência (B) de <i>L. rhamnosus</i> nos sucos controle (SC), com inulina (SI), com xilitol (SX) e com inulina e xilitol (SIX) à base de polpa de maracujá durante estoque refrigerado.	88
Figura 21 – Valores dos pHs para os sucos controle (SC), com inulina (SI), com xilitol (SX) e com inulina e xilitol (SIX) à base de polpa de maracujá durante estoque refrigerado.	91
Figura 22 – Valores obtidos no início do estoque refrigerado do °Brix para o suco controle (SC), suco com inulina (SI), suco com xilitol (SX) e suco com inulina e xilitol	

(SIX) à base de polpa de maracujá. Diferentes letras maiúsculas indicam que os valores diferem significativamente ($\alpha \leq 0.05$) entre as bebidas. 94

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Siglas e condições das fermentações realizadas no meio padrão (MRS) e nos meios à base de polpa de manga, maracujá e goiaba. As letras t e r, correspondem ao tipo de seleção ácida realizada, ou seja, seleção total e reduzida, respectivamente. As fermentações realizadas em pH 4 correspondem a seleção parcial.	42
Tabela 2 – Composição físico-química das polpas de manga, maracujá e goiaba.	47
Tabela 3 – Concentrações para glicose, frutose e ácido láctico nos sucos controle (SC), com inulina (SI), com xilitol (SX) e com inulina e xilitol (SIX) à base de polpa de manga em 0 e 60 dias de estoque refrigerado.	83
Tabela 4 – Concentrações para glicose, frutose e ácido láctico nos sucos controle (SC), com inulina (SI), com xilitol (SX) e com inulina e xilitol (SIX) à base de polpa de maracujá em 0 e 60 dias de estoque refrigerado.	92
Tabela 5 – Viabilidade inicial (V_i) e final (V_f), assim como a sobrevivência (S %), de <i>L. rhamnosus</i> ATCC 7469 na simulação das condições gastrointestinais durante estoque refrigerado nos sucos controle (SC), com inulina (SI), com xilitol (SX) e com inulina e xilitol (SIX) à base de polpa de manga.	95

LISTA DE ABREVIATURA E SIGLAS

ANOVA - Análise de Variância

ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária

ART – Açúcares redutores totais

ATCC – American Type Culture Collection

BALs – Bactérias ácido-láticas

CLAE – Cromatografia Líquida de Alta Eficiência

DAD – Detector por Arranjo de Diodo

EUA – Estados Unidos da América

FAO – Food and Agriculture Organization

FDA – Food and Drug Administration

FOS – frutooligossacarídeos

GOS – galacto-oligossacarídeos

IAL – Instituto Adolfo Lutz

m.s. – Matéria seca

$\mu_{\max}$ – velocidade específica máxima de crescimento

MAPA – Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento

MRS – de Man, Rogosa & Sharpe

OMS – Organização Mundial de Saúde

RI – Detector de índice de refração

S (%) – Sobrevivência em porcentagem

SC – Suco controle

SI – Suco com inulina

SIX – Suco com inulina e xilitol

SX – Suco com xilitol

TSGI – Teste de Simulação das Condições Gastrointestinais

UFC – Unidade Formadora de Colônia

V_f – Viabilidade Final

V_i – Viabilidade inicial

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	17
2 OBJETIVOS	19
2.1 OBJETIVO GERAL	19
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	19
3 REFERENCIAL TEÓRICO	20
3.1 PROBIÓTICOS	20
3.1.1 <i>Lactobacillus</i>	22
3.2 ALIMENTOS FUNCIONAIS.....	26
3.2.1 Sucos probióticos à base de fruta	28
3.2.2 Inulina	30
3.2.3 Xilitol	32
3.3 SOBREVIVÊNCIA DE PROBIÓTICOS FRENTE ÀS CONDIÇÕES DE ESTRESSE	34
4 MATERIAIS E MÉTODOS.....	37
4.1 MICRO-ORGANISMO.....	37
4.2 POLPAS DE MANGA, MARACUJÁ E GOIABA.....	37
4.3 FORMULAÇÃO DOS MEIOS DE CULTURA	37
4.4 MÉTODOS ANALÍTICOS.....	38
4.4.1 Caracterização das polpas	38
4.4.2 Determinação da viabilidade celular	38
4.4.3 Determinação do pH	38
4.4.4 Quantificação das concentrações de glicose, frutose e ácido lático por CLAE	39
4.4.5 Determinação de açúcares redutores totais	39
4.5 ESTUDO DO CRESCIMENTO DE <i>L. rhamnosus</i> ATCC 7469 NOS SUCOS DE MANGA, MARACUJÁ E GOIABA	40
4.6 FERMENTAÇÕES EM CONDIÇÕES DE ESTRESSE ÁCIDO.....	40

4.6.1 Determinação da velocidade específica máxima de crescimento para <i>L. rhamnosus</i>	43
4.7 ELABORAÇÃO DOS SUCOS PROBIÓTICOS FERMENTADOS CONTENDO INULINA E XILITOL	43
4.8 TESTE DE SIMULAÇÃO DAS CONDIÇÕES GASTROINTESTINAIS	44
4.9 ANÁLISE DE DADOS	46
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	47
5.1 COMPOSIÇÃO FÍSICO-QUÍMICA DAS POLPAS	47
5.2 ESTUDO CINÉTICO DAS FERMENTAÇÕES REALIZADAS EM MEIOS DE CULTURA SEM ESTRESSE ÁCIDO	48
5.3 ESTUDO CINÉTICO DAS FERMENTAÇÕES REALIZADAS EM MEIOS DE CULTURA COM ESTRESSE ÁCIDO	57
5.3.1 Influência da acidificação do meio MRS sobre o crescimento de <i>L. rhamnosus</i> ATCC 7469	57
5.3.2 Influência da acidificação dos meios dos sucos de frutas sobre a viabilidade de <i>Lactobacillus rhamnosus</i>	61
5.3.3 Comparação da sobrevivência de <i>L. rhamnosus</i> nos meios de manga, maracujá e goiaba em pH ajustados para 2 durante seleção total e reduzida	72
5.3.4 Sobrevivência de <i>L. rhamnosus</i> ATCC 7469 no TSGI	74
5.4 ELABORAÇÃO DE BEBIDAS FUNCIONAIS DE POLPA DE MANGA E MARACUJÁ	77
5.4.1 Bebidas de manga	77
5.4.2 Bebidas de maracujá	86
5.4.3 Sobrevivência de <i>L. rhamnosus</i> nos sucos fermentados nas simulações gastrointestinais	95
6 CONCLUSÕES	98
7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	99
APÊNDICE A	116
APÊNDICE B	117

1 INTRODUÇÃO

A conscientização em relação à alimentação e prevenção de doenças vem impulsionando o consumo de alimentos funcionais. O crescimento desse setor está baseado principalmente nos benefícios de tais produtos para uma ou mais funções fisiológicas do organismo, favorecendo a saúde, melhorando a qualidade de vida e auxiliando na redução de riscos de enfermidades (SILVA et al., 2016).

Dentre os alimentos que se enquadram nesse aspecto e que vem ganhando popularidade e aceitação do mercado consumidor estão as bebidas probióticas fermentadas. Apesar de ser mais usual a utilização de matrizes lácteas para o desenvolvimento desse tipo de produto, estudos que visem bebidas não lácteas tem se tornado uma atraente proposta para o setor de inovação alimentar, especialmente por fatores como aumento do vegetarianismo, intolerância à lactose e alto teor de colesterol em produtos lácteos (NEMATOLLAHI et al., 2016).

Os sucos de frutas vêm sendo considerados uma boa aposta para serem utilizados como veículos ideais de culturas probióticas (FARIAS et al., 2016) devido à presença de minerais, vitaminas, fibras dietéticas e antioxidantes (ESPINOZA & NAVARRO, 2010). Dentre as bactérias ácido lácticas utilizadas para produção de produtos funcionais fermentados, *Lactobacillus rhamnosus* apresenta versatilidade para crescer em diferentes matrizes e é reconhecido por sua resistência à bile e capacidade de adesão à camada epitelial do intestino (DORON et al., 2005).

Um dos fatores mais importantes no contexto dos alimentos probióticos está na garantia de que o micro-organismo será capaz de sobreviver às condições gastrointestinais. Estudos têm demonstrado que a pré-adaptação a condições de estresse pode conferir resistência e/ou melhorar a viabilidade de diferentes espécies de *Lactobacillus* (DESMOND et al., 2001; DE ANGELIS et al., 2001; KIM et al., 2001; DESMOND et al., 2002; DE ANGELIS et al., 2004; SAARELA et al., 2004; STREIT et al., 2008; MATHIPA & THANTSHA, 2015).

Porém, além de garantir a sobrevivência probiótica após consumo, outro aspecto fundamental está na adição de aditivos que potencializam a saúde intestinal, como por exemplo os prebióticos. A combinação de probióticos e prebióticos torna esses componentes mais eficientes após chegada no cólon do que quando consumidos individualmente (WANG et al., 2017), fornecendo assim um efeito simbiótico (SHI & GUO, 2020).

A inulina é demonstrada como fibra dietética solúvel capaz de promover o crescimento seletivo de micro-organismos no cólon, melhorar a imunidade do hospedeiro, reduzir o nível de glicose no sangue, manter o equilíbrio metabólico dos lipídeos e melhorar a disponibilidade de minerais (KAUR & GUPTA, 2002). Além disso, possui baixo teor de açúcar, podendo assim ser facilmente utilizada em produtos de baixas calorias e para diabéticos (AIDOO et al., 2015).

Um alimento funcional, além de promover benefício à saúde, também necessita ser atraente ao paladar do consumidor. Tradicionalmente, as bebidas são adoçadas com sacarose. Por ser encontrado em diferentes alimentos, seu consumo em excesso pode levar a uma série de problemas, muito além das cáries, como diabetes e obesidade (MANHANI et al., 2014; HIGGINS & MATTES, 2019). Uma alternativa para substituí-lo é a utilização do xilitol, tanto por ser um adoçante hipocalórico quanto por seu consumo estar relacionado à regulação da glicose, modificação da microbiota intestinal e prevenção do aparecimento de cárie (SODERLING et al., 2008; UEBANSO et al., 2017).

Neste contexto, o presente estudo teve como objetivo a produção de sucos probióticos de manga, maracujá e goiaba, fermentados por *Lactobacillus rhamnosus* ATCC 7469. Para isso, investigou-se o efeito do estresse ácido sobre o metabolismo probiótico, bem como a adição de inulina e xilitol após a fermentação, para a avaliação do estoque refrigerado de sucos simbióticos.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Produzir sucos probióticos e fermentados de manga, maracujá e goiaba, avaliando o estresse ácido durante a fermentação e a adição de inulina e xilitol nos sucos potencialmente simbióticos em estoque refrigerado.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Analisar a composição físico-química das polpas de manga, maracujá e goiaba;
- Comparar o crescimento de *Lactobacillus rhamnosus* nos meios de manga, maracujá e goiaba;
- Promover seleção de células de bactérias nos meios à base de fruta resistentes ao estresse ácido;
- Comparar e acompanhar o pH e as concentrações de glicose, frutose e ácido láctico nas fermentações, bem como em estoque refrigerado;
- Comparar e acompanhar a sobrevivência de *Lactobacillus rhamnosus* durante simulação das condições gastrointestinais nos meios de fruta e no meio controle;
- Elaborar bebidas fermentadas a partir dos resultados obtidos após fermentações sucessivas em estresse ácido;
- Determinar a estabilidade físico-química, bem como da viabilidade, dos sucos fermentados durante estoque refrigerado;
- Verificar a influência da adição de inulina e de xilitol nos sucos, após fermentação, sobre a sobrevivência de *Lactobacillus rhamnosus* ATCC 7469 durante estoque refrigerado e na simulação das condições gastrointestinais.

3 REFERENCIAL TEÓRICO

3.1 PROBIÓTICOS

Em 1954, Ferdinand Vergin concebeu o termo probiótico, que em grego significa “para a vida”, em um artigo intitulado "Anti-und Probiotika". Em seu trabalho, Ferdinand Vergin listou diferentes bactérias úteis e determinou os prejuízos trazidos por agentes bacterianos e antibióticos para a microbiota intestinal. Anos depois, em 1965, Lilly e Stillwell descreveram os probióticos como micro-organismos benéficos (AZAD et al., 2018).

Com o passar dos anos, o termo probiótico foi ganhando popularidade, assim como investigações que visam determinar a aplicabilidade destes micro-organismos. Em 2001, a Organização para a Agricultura e a Alimentação (FAO) e a Organização Mundial da Saúde (OMS) convocaram uma consulta conjunta de especialistas para avaliar as propriedades nutricionais e de saúde em alimentos com probióticos. Dessa forma, o objetivo desse grupo foi identificar e delinear os requisitos mínimos necessários para um micro-organismo probiótico (FAO/WHO, 2002).

A partir da consulta conjunta entre especialistas, os probióticos passaram a ser definidos pela FAO/WHO (2002) como “micro-organismos vivos que, quando administrados em quantidades adequadas, conferem benefício à saúde do hospedeiro”. Desde então, essa definição se tornou a versão mais adotada e aceita em todo o mundo, e partir disso as evidências científicas e clínicas progrediram rapidamente, assim como o desenvolvimento de vários produtos probióticos, os quais receberam a atenção legítima das autoridades reguladoras (HILL et al., 2014).

Para que um micro-organismo seja considerado probiótico, ele deve apresentar alguns critérios fundamentais. Primeiramente, as cepas não podem ser patogênicas, nem tóxicas ao hospedeiro. Devem apresentar alguns aspectos funcionais característicos, como resistência às condições do trato gastrointestinal e ao ácido biliar. Dessa forma, o micro-organismo poderá aderir à mucosa intestinal, impedindo que as células sejam lavadas e, portanto, permitindo colonização temporária, modulação imunológica e exclusões competitivas de patógenos (SHEWALE et al., 2014).

Em virtude do importante papel na manutenção do equilíbrio imunológico no trato gastrointestinal através da interação direta com as células imunes, os micro-organismos probióticos tem sido amplamente estudado, em especial, espécies dos gêneros *Lactobacillus*, *Bifidobacterium* e *Saccharomyces* (WILKINS & SEQUOIA, 2017). A relação entre saúde e composição da microbiota intestinal aumentou o interesse da administração de espécies probióticas para a prevenção de algumas doenças em humanos e animais (AZAD et al., 2018), o que potencializou a busca por veículos ideais para a incorporação desses micro-organismos ao dia a dia dos consumidores.

Um número crescente de produtos comerciais contendo probióticos está disponível no mercado, sejam eles alimentos, suplementos alimentares ou medicamentos (KOLAČEK et al., 2017). Contudo, é sabido que independente da matriz utilizada essas formulações devem manter-se estáveis ao longo da vida de prateleira, bem como o probiótico deve permanecer viável durante o prazo de validade do produto, para que assim possa conferir benefício ao ser consumido (COLLADO et al., 2009; SHEWALE et al. 2014).

Quando nos referimos especificamente aos produtos alimentares, populações de 10^6 - 10^7 UFC/g ou mL no produto final são estabelecidas como quantidades eficientes de culturas probióticas para alimentos processados, uma vez que equivalem 10^8 - 10^9 UFC, fornecidas por um consumo diário de 100 g ou 100 ml de alimento, beneficiando assim a saúde humana (SAAD, 2006; COMAN et al., 2012). Desta maneira, o probiótico poderá enfrentar o trato gastrointestinal e reter as propriedades funcionais necessárias para assim ter seu efeito benéfico comprovado (KOLAČEK et al., 2017).

No último ano, os probióticos vêm recebendo destaque no cenário mundial, especialmente por sua ação como moduladores de respostas imunes do hospedeiro. A utilização destes micro-organismos tem sido apontada como uma alternativa terapêutica para infecções virais, como a do COVID-19 (SARS-CoV-2) (SINGH & RAO, 2021). Segundo Al-Ansari et al. (2021), os probióticos que atuam na manutenção da homeostase intestinal, merecem a atenção científica, uma vez que podem melhorar a função dos linfócitos NK (Natural Killer), estimular anticorpos IgA e controlar inflamações da barreira mucosa,

favorecendo assim a imunidade e consecutivamente favorecendo o tratamento do SARS-CoV-2.

Desta forma, esses micro-organismos possuem potencial para serem utilizados com adjuvantes no combate a esta doença (DARBANDI et al., 2021). No entanto, o uso de probióticos contra a infecção por Coronavírus nos campos clínico e medicinal ainda é uma questão em discussão e que necessita considerar a seleção de espécies bacterianas que atuem efetivamente no combate à pandemia (SINGH & RAO, 2021).

3.1.1 *Lactobacillus*

O gênero *Lactobacillus* foi proposto pela primeira vez há mais de 100 anos, em 1901, por M. W. Beijerinck (OZOGUL et al., 2020). As espécies pertencentes a este gênero compõem um grupo parafilético de bactérias ácido-láticas (BALs), cujo ácido láctico é o principal produto final da fermentação de carboidratos (ROSSI et al., 2019). Este gênero é composto por espécies que se diferem taxonomicamente principalmente pelo tipo de via metabólica utilizada na fermentação de açúcares, assim como pelos produtos finais originados.

Desta maneira, as espécies deste gênero são divididas em três grupos: (I) homofermentativo, que produzem ácido láctico como produto final do metabolismo de carboidratos pela via glicolítica (Embden-Meyerhorf-Parnas); (II) heterofermentativo facultativo, composto por espécies que produzem uma mistura de ácido láctico e ácido acético como produtos finais do metabolismo de carboidratos através da glicólise ou da via da fosfocetolase, e; (III) heterofermentativo obrigatório, que geram como produtos finais do metabolismo dos carboidratos, por meio via da fosfocetolase, ácido láctico e ácido acético, ou etanol, e CO₂ (KANDLER, 1983; VALENZUELA et al., 2015; ROSSI et al., 2019)

Em geral, as BALs se distribuem em habitats com um rico suprimento nutricional, podendo ser encontradas em vegetais e frutas em decomposição, produtos lácteos, carne e peixe fermentados, beterraba, batata, chucrute, fermento, legumes em conserva, silagem, bebidas, plantas, água, sucos, em esgoto e em cavidades de humanos e animais (KÖNIG & FRÖHLICH, 2009). Além disso, este grupo apresenta importância econômica e nutricional devido à

sua utilização na produção e preservação de diversos produtos fermentados (PIMENTEL et al., 2019).

Há séculos, os lactobacilos são utilizados em processos de fermentação para transformar matérias-primas perecíveis em produtos mais conserváveis, desempenhando assim um importante papel na produção de laticínios, pães, embutidos, vegetais fermentados, vinho e silagem (ROSSI et al., 2019). Além disso, espécies desse gênero, dentre as quais está *L. rhamnosus*, são largamente utilizadas como suplementos probióticos (SUEZ et al., 2019).

3.1.1.1 *Lactobacillus rhamnosus*

Dentre as espécies do gênero *Lactobacillus*, *Lactobacillus rhamnosus* é um dos probióticos mais utilizados, seja na elaboração de iogurtes (JIA et al., 2016), produtos cárneos fermentados (DE MACEDO et al., 2005), bebidas ou queijo de soja (LIU et al., 2006; SANTOS et al., 2014; MISHRA et al., 2019), e na produção de bebidas à base de frutas (CHAMPAGNE & GARDNER, 2008; CHAMPAGNE et al., 2009; FARIAS et al., 2016; NEMATOLLAHI et al., 2016; SANTOS et al., 2017; ANDRADE et al., 2019) esse micro-organismo vem demonstrando cada vez mais sua versatilidade e capacidade de sobreviver em diferentes matrizes lácteas e não lácteas.

As bactérias ácido lácticas têm como principal produto catabólico da glicólise o ácido láctico, dessa forma, podendo ser encontradas naturalmente em uma grande variedade de habitats ecológicos, como cavidade oral, trato intestinal, na vagina, além de laticínios artesanais e industriais (KÖNIG & FRÖHLICH, 2009; DOUILLARD et al., 2013).

O *L. rhamnosus*, foi classificado originalmente como *L. casei*, entretanto após estudos genéticos e taxonômicos foi reclassificado (ORLA-JENSEN, 1919; HANSEN; LESSEL, 1971; TYNKKYNEN et al., 1999). Esse micro-organismo é uma bactéria anaeróbia aerotolerante, Gram-positiva e de morfologia bacilar (BERNARDEU et al., 2008; MADIGAN et al., 2010). Possui metabolismo heterofermentativo facultativo (ROSSI et al., 2019) e é comumente cultivada em meio MRS (de Man, Rogosa, Sharpe) por suprir suas necessidades metabólicas

a uma temperatura de 37 °C, contudo cepas distintas podem ter diferentes necessidades (CHANG & LIEW, 2012).

O seu potencial probiótico já foi largamente investigado e algumas linhagens apresentam um longo histórico de uso seguro (DORON & SNYDMAN, 2015; YAZDANKHAH et al., 2019). No Brasil, esse micro-organismo é classificado como probiótico (BRASIL, 2008) e estudos têm demonstrado sua habilidade no tratamento ou na prevenção de doenças como infecções do trato respiratório e intestinal (HOJSAK et al., 2010), no combate a gastroenterite pediátrica (VANDENPLAS et al., 2015), asma (JANG et al., 2012), vírus de herpes tipo 1 (KHANI et al., 2012), dermatite (MARSELLA et al., 2012) e artrite reumatoide (NOWAK et al., 2012).

O uso oral de *L. rhamnosus*, associado com *L. reusteri*, diminuiu a taxa de colonização vaginal e retal por *Streptococos* do grupo B em gestantes, reduzindo assim o risco de infecção nos recém-nascidos e seu uso profilático diário evita infecções em crianças desnutridas, melhorando assim o estado nutricional desde que associado a uma dieta apropriada (HO et al., 2016; KARA et al., 2019). Também foi relatado por trazer benefícios à saúde bucal, reduzindo os níveis salivares de *Streptococcus mutans*, bactéria capaz de gerar cáries (RUNGSRI et al., 2017). Além disso, pode ser utilizado como adjuvante no tratamento do câncer, atuando como terapia complementar para curar a disbiose característica desse quadro clínico (VIVARELLI et al. 2019).

No entanto, a deficiência de produtos probióticos vegetais no mercado persistem e a necessidade de identificar linhagens capazes de crescer, e se manterem viáveis em tais matrizes se torna cada vez mais necessária. Entre as diferentes linhagens de *L. rhamnosus*, estudos vêm demonstrando o potencial da linhagem ATCC 7569 para ser utilizado na geração de novos produtos funcionais, como por exemplo sucos fermentados (FARIAS et al., 2016; SANTOS et al., 2017; ANDRADE et al., 2019).

Estudos têm demonstrado que *L. rhamnosus* ATCC 7469 possui atividade protetora contra *Escherichia coli* (LI, et al. 2012; ZHU et al., 2014). Li et al. (2012) verificaram que o pré-tratamento com doses de 10^{10} UFC/d durante uma semana em leitões, modelo ideal para o estudo de doenças gastrointestinais

humanas, pode moldar a composição da microbiota intestinal, atenuando as respostas inflamatórias e retardando a progressão da diarreia infecciosa (LI et al. 2012). Por sua vez, Zhu et al. (2014) constataram que a administração prévia dessa cepa auxilia no combate de infecções por *E. coli* pela geração de células T na lâmina própria (mucosa) e pela expansão celular do adesivo de Peyer (agrupamentos de folículos linfoides) no intestino delgado. No entanto, os autores ressaltam que a administração de elevadas doses do probiótico reduzem os benefícios profiláticos contra possíveis patógenos entéricos, sendo assim necessário maiores investigações sobre dosagens ideais para consumo.

Outro estudo realizado *in vivo*, mostrou que *L. rhamnosus* ATCC 7469 pode ser utilizado como controle eficaz na progressão de câncer do cólon (ZAHARAN et al., 2017). Também pode atuar na modulação de respostas imune em macrófagos, conferindo assim benefícios à saúde do hospedeiro, devido a sua influência sobre sistema imune (JORJÃO et al., 2015). Além dos benefícios acima citados, a linhagem padrão ATCC 7469 tem potencial para melhorar o desempenho de crescimento, qualidade da carne e imunidade em truta arco-íris, devido a sua atividade como probiótico (HOOSHYAR et al., 2020).

Apesar de ser um micro-organismo nutricionalmente exigente (CHANG & LIEW, 2012), *L. rhamnosus* ATCC 7469 tem sido utilizado na elaboração de diferentes produtos probióticos, como suco de cereja (NEMATOLLAHI et al., 2016), embutidos fermentados e sorvete à base de extrato solúvel de soja (DE MACEDO et al., 2008; FERNÁNDEZ, 2015). Por sua vez, a utilização desse micro-organismo no desenvolvimento de bebidas fermentadas formuladas a partir de frutas vem ganhando destaque, uma vez que tem sido relatado sua capacidade de crescer e manter-se viável em diferentes meios vegetais, como será descrito abaixo.

L. rhamnosus ATCC 7469 foi utilizado na elaboração de suco probiótico fermentado de Maracujá da Caatinga (*Passiflora cincinnata* Mast.), no qual o micro-organismo alcançou viabilidade maior que 8 Log UFC/mL, produção de ácido láctico (cerca de 6 g/L) e manteve-se viável durante 28 dias em estoque refrigerado (FARIAS et al., 2016). Em 2017, outra bebida à base de Maracujá da Caatinga (*Passiflora cincinnata* Mast.) foi elaborada, mas desta vez foi

adicionada pectina à formulação, a qual teve influência sobre a sobrevivência do micro-organismo nas condições gastrointestinais simuladas (SANTOS et al., 2017).

Além de bebidas à base de maracujá, *L. rhamnosus* ATCC 7469 também foi utilizado na elaboração de sucos fermentado e não fermentado de goiaba (*Psidium guajava* L.) com adição de inulina, prebiótico este que potencializou a sobrevivência do probiótico em estoque refrigerado (ANDRADE et al., 2019). Por sua vez, em 2020, Barros desenvolveu bebidas probióticas fermentadas à base de goiaba (*Psidium guajava* L.) e acerola (*Malpighia puniceifolia* L.), previamente esterilizadas por termossonicação. Sendo assim, foi possível constatar que essa linhagem pode ser utilizada na produção de sucos fermentados de Maracujá, Goiaba e Acerola.

A cada ano o número de trabalhos referentes a *L. rhamnosus* ATCC 7469 vem crescendo e trazendo novas informações sobre este probiótico. Além dos benefícios que pode causar, esta linhagem é capaz de resistir às condições do ambiente gastrointestinal, como baixo pH e sais biliares, sinalizando assim sua habilidade de se manter viável após tais condições de estresse (SUCCI et al., 2005; FARIAS et al., 2016; SANTOS et al., 2017; ANDRADE et al., 2019).

3.2 ALIMENTOS FUNCIONAIS

O consumo de alimentos funcionais tem se mostrado uma tendência mundial, o que se deve especialmente pelo fato de os consumidores estarem cada vez mais conscientes da relação entre o perfil alimentar e a prevenção de doenças. Nesse contexto, o mercado de alimentos funcionais é um dos segmentos que tem apresentado rápido crescimento na indústria global (VORAGE et al., 2020).

A relação entre alimentação e saúde tem impulsionado a busca por novos alimentos funcionais. Além de seus recursos nutricionais, o consumo desses alimentos também pode beneficiar as funções fisiológicas do organismo, melhorando o estado de saúde ou bem-estar e reduzindo o risco de doenças,

como obesidade, diabetes, hipertensão, doenças cardiovasculares, dentre outras (FREITAS et al., 2012; ALKHATIB et al., 2017; ASGARY et al., 2018).

No Brasil, a Agência de Vigilância Sanitária (ANVISA), atualizou, em 11 de dezembro de 2018, a lei nº 18 e 19 de 30 de abril de 1999. A partir disso, pela primeira vez, uma definição oficial para o termo “alimento funcional” foi estabelecida em nosso país. Sendo assim, os alimentos funcionais, além de nutrir, garantem outros benefícios à saúde. Eles contêm constituintes que podem auxiliar, por exemplo, na manutenção de níveis saudáveis de triglicerídeos; na proteção das células contra os radicais livres; no funcionamento do intestino; na redução da absorção do colesterol; entre outros, desde que seu consumo esteja associado a uma alimentação equilibrada e a hábitos de vida saudáveis (BRASIL, 2018).

Ainda de acordo com a ANVISA, ingredientes como ácidos graxos, carotenoides, fibras alimentares, fitoesteróis, polióis, probióticos, proteína de soja e quitosana são considerados funcionais (BRASIL, 2016a). O crescente interesse por esses componentes está baseado especialmente nos benefícios que seu consumo traz a uma ou mais funções fisiológicas do organismo, favorecendo a saúde, melhorando a qualidade de vida e auxiliando na redução de riscos de enfermidades (SILVA et al., 2016).

De acordo com Suez et al. (2019), os probióticos são um dos suplementos alimentares mais consumidos no mundo, e isso pode ser atribuído especialmente a evidências científicas que têm descrito seus efeitos benéficos. Muito já se é conhecido acerca das linhagens probióticas, sendo agora o principal alvo no estudo e desenvolvimento desses produtos a busca por novas matérias primas que possam ser utilizadas como veículos para tais micro-organismos.

Nos últimos anos tem havido crescente interesse no desenvolvimento de produtos probióticos não lácteos, uma vez que, tradicionalmente, esse mercado é dominado por laticínios. Fatores como o aumento da popularidade do vegetarianismo, intolerância à lactose, alto teor de colesterol em produtos lácteos e alergia à proteína do leite tem impulsionado a demanda por alternativas não lácteas (ALVES et al., 2016; NEMATOLLAHI et al., 2016).

3.2.1 Sucos probióticos à base de fruta

A utilização de sucos de fruta é uma boa aposta para a elaboração de bebidas probióticas. A presença de minerais, vitaminas, fibras dietéticas e antioxidantes (ESPINOZA & NAVARRO, 2010), além dos carboidratos inerentes a fruta, tornam esses vegetais possíveis substratos para culturas probióticas (MONTANARI et al., 2020). Por ser uma fonte alimentar natural, podem ser consumidos visando uma dieta saudável. Além disso, alguns sucos auxiliam na modulação de fatores de risco para doenças cardiovasculares, função endotelial, reatividade plaquetária e metabolismo de lipídios (HYSON, 2015).

Os sucos de fruta têm atraído o interesse do setor de inovação alimentar para o desenvolvimento de bebidas probióticas, especialmente por serem matrizes ricas em compostos bioativos (PIMENTEL et al., 2020). Juntamente com os cereais, os vegetais e a soja, as frutas estão sendo utilizadas para elaboração de alimentos probióticos não lácteos (LEBAKA et al., 2018) e de caráter vegano. Sendo assim, a busca por novos sabores funcionais (MONTANARI et al., 2020), tem impulsionado estudos que visem formulação inovadoras.

Algumas espécies de lactobacilos e bifidobactérias apresentam elevada tolerância a ambientes ácidos (SHORI, 2016), sendo assim capazes de serem utilizados para a geração de diferentes bebidas à base de fruta (NEMATOLLAHI et al., 2016; SANTOS FILHO et al., 2019; ROOBAB et al., 2020; VIEIRA et al., 2020). Porém, além de avaliar o desempenho do probiótico no suco, a escolha da fruta deve levar em consideração sua disponibilidade regional como recurso alimentar.

No Brasil, dentre as polpas que podem ser utilizadas para a elaboração de sucos probióticos, estão a Manga (*Mangifera indica* L.), o Maracujá (*Passiflora edulis*) e a Goiaba (*Psidium guajava* L.). A região nordeste é um dos maiores produtores destas frutas tropicais (EMBRAPA, 2004; EMBRAPA, 2015; EMBRAPA, 2019; CAVICHIOLI et al., 2020). Segundo a Instrução Normativa nº 12, de 04 de setembro de 2003, do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA), os sucos de manga e maracujá devem possuir concentrações mínima de 50% e 12% para a polpa, respectivamente, desde que

adoçados. Por sua vez, o suco de goiaba deve apresentar no mínimo 35 % de polpa (MAPA, 2003).

As concentrações de carboidratos, minerais, carotenoides, vitaminas e fibras dietéticas torna a manga uma matriz ideal para a sobrevivência probiótica (ACEVEDO-MARTÍNEZ et al., 2018). A polpa de maracujá, por sua vez, contém quantidades significativas de β -caroteno, riboflavina, niacina (vitamina B3), cálcio, fósforo e ácido ascórbico (vitamina C), com teor moderado de carboidratos e baixo conteúdo de gordura (CORRÊA et al., 2016). Adicionalmente, a goiaba, além de conter fibras e licopeno (MONTANARI et al., 2020), é uma fonte potencial de minerais, açúcares e ácido ascórbico (TANWAR et al., 2014).

Estudos têm sido realizados com o propósito de averiguar a sobrevivência probiótica em sucos de manga (ACEVEDO-MARTÍNEZ et al., 2018), maracujá (SANTOS et al., 2017) e goiaba (ANDRADE et al., 2019). Dentre esses trabalhos, a fermentação foi uma das estratégias utilizadas para melhorar o desempenho das culturas probióticas, uma vez que isso contribui não apenas para a preservação dos alimentos (MIN et al., 2018), devido a produção de bacteriocinas, que evitam a contaminação durante o armazenamento (PEREIRA & RODRIGUES, 2018), mas também proporciona maior viabilidade para a cultura probiótica (PIMENTEL et al., 2020).

No entanto, a deficiência de produtos probióticos vegetais no mercado persistem e a necessidade de identificar linhagens capazes de crescer, e se manterem viáveis em tais matrizes se torna cada fruta em um alimento probiótico: a adição do micro-organismo ao suco com posterior fermentação ou não (PEREIRA & RODRIGUES, 2018). A fermentação apresenta algumas vantagens pois ocorre a produção de novos compostos, reduzindo o teor de açúcar, melhorando o valor nutricional e estendendo a vida útil da bebida (RODRÍGUEZ et al., 2020). Além disso, o crescimento do probiótico no suco resulta em um produto com uma cepa microbiana mais adaptada, o que pode contribuir para taxas de sobrevivência mais altas, aumentando a qualidade do produto (PEREIRA & RODRIGUES, 2018).

Assim como a fermentação, a adição de aditivos que potencializam a ação probiótica, bem como a saúde do intestino tem sido utilizada em novas formulações funcionais. Dentro deste contexto, estão os prebióticos, “ingredientes fermentados seletivamente que permite alterações específicas, tanto na composição quanto na atividade da microbiota gastrointestinal, e que desta forma conferem benefícios ao bem-estar e a saúde do hospedeiro” (SLAVIN, 2013).

3.2.2 Inulina

A inulina é um frutano capaz de promover benefícios à saúde, especialmente por seu papel como fibra alimentar (NI et al., 2019). Este polímero natural é formado por 11 a 65 unidades de frutose e uma unidade de glicose terminal, organizados linearmente e unidos pelos elos β (2-1), que é resistente à hidrólise enzimática do trato gastrointestinal humano (FLINT et al., 2012; NAZZARO et al., 2012; ROLIN, 2015).

Assim como os demais frutanos, possui caráter bifidogênico (ROLIN, 2015) e vem sendo adotado como ingrediente funcional, especialmente por sua eficácia como prebiótico (NI et al., 2019; AHMED & RASHID, 2017), já que pode ser fermentada no intestino, gerando assim ácidos graxos de cadeia curta (AGCC) (MIREMADI & SHAH, 2012). A maior parte desses ácidos, formados pelas bactérias intestinais por meio da fermentação sacarolítica, é absorvida e metabolizada, contribuindo para o ganho energético do hospedeiro (MIREMADI & SHAH, 2012).

Dentre as vantagens do consumo da inulina estão o crescimento seletivo de probióticos no cólon, a melhoria da imunidade do hospedeiro, a redução do nível de glicose no sangue, a manutenção do equilíbrio metabólico de lipídeos e a melhora da disponibilidade de minerais (KAUR & GUPTA, 2002). Além disso, por possuir baixo teor de açúcar, pode ser utilizada em produtos de baixas calorias e para diabéticos (AIDOO; AFOAKWA; DEWETTINCK, 2015).

Devido às suas propriedades físico-químicas e funções fisiológicas, a inulina tem sido amplamente aplicada no desenvolvimento de produtos, sejam eles alimentares ou farmacêuticos (NI et al., 2019). Juntamente com os fruto-

oligossacarídeos (FOS) e os galacto-oligossacarídeos (GOS), é um dos prebióticos mais utilizados nos mercados da Austrália, Europa e Estados Unidos (SIMS et al., 2014).

Além de poder ser consumida isoladamente, a inulina tem sido incorporada juntamente com probióticos em diferentes alimentos, como bebida não láctea (ANDRADE et al., 2019), sorvete (BALTHAZAR et al., 2018), filme comestível (OROZCO-PARRA et al., 2020) e queijo (ARAÚJO et al., 2010), originando assim formulações simbióticas (FLINT et al., 2012).

Segundo Rolin (2015), os simbióticos podem ser utilizados no combate de inflamações intestinais por proporcionarem o crescimento de lactobacilos e bifidobactérias endógenas. Rafter et al. (2007), estudando pacientes com câncer de cólon, verificaram que a intervenção simbiótica, utilizando inulina, *L. rhamnosus* e *B. lactis*, resultou no aumento significativo de *Bifidobacterium* e *Lactobacillus*, e diminuição de *Clostridium perfringens* na microbiota fecal. De acordo com o mesmo autor, combinações deste tipo podem representar um meio viável de quimioprevenção do câncer de cólon em humanos, por promover alterações na composição do ecossistema bacteriano na região do cólon.

A inulina vem sendo utilizada na manutenção da viabilidade probiótica durante armazenamento (SOUKOULIS et al., 2014). Sua associação com *L. rhamnosus* para a elaboração de bebidas à base de goiaba, foi capaz de potencializar a sobrevivência probiótica em 10% e 19%, em suco não fermentado e fermentado, respectivamente, quando em estoque refrigerado (ANDRADE et al., 2019).

Além disso, estudos observaram que a inulina pode apoiar o crescimento de *L. acidophilus*, *Bifidobacterium lactis* e *L. rhamnosus* (SIMS et al., 2014), assim como possui efeito protetor sobre *L. casei*, aumentando sua sobrevivência em condições gástricas simuladas (OROZCO-PARRA et al., 2020). Desta forma, os efeitos protetores proporcionados pela inulina sobre diferentes probióticos, tornam esse frutano uma alternativa promissora para a elaboração de novas formulações de caráter simbiótico.

3.2.3 Xilitol

Um dos aspectos mais importantes no desenvolvimento de novos produtos alimentares consiste na sua palatabilidade. Este aspecto se torna ainda mais importante quando nos referimos a produtos que não são considerados tradicionais, ou seja, que não são comumente consumidos pela população. O Brasil é o 4º maior consumidor de açúcar no mundo, e esse cenário está diretamente relacionado a problemas de insegurança alimentar da população, especialmente quando nos referimos ao sobrepeso e a obesidade, os quais podem influenciar no desenvolvimento de doenças crônicas não transmissíveis, como problemas de coração, câncer, depressão e diabetes (BRASIL, 2016b).

Em virtude disso, a incorporação no produto de adoçantes que agradem a população e que tragam benefícios à saúde do consumidor devem ser consideradas. Uma boa opção para tal propósito consiste na utilização do xilitol, adoçante hipocalórico, que está incluso no grupo dos edulcorantes, cujo consumo proporciona ingestão de menos calorias por grama se comparado à sacarose (DOSSIÊ EDULCORANTES, 2013).

Quando comparamos o índice calórico, o xilitol apresenta 2,4 kcal/g, enquanto a sacarose possui 4,0 kcal/g, isto significa que sua utilização pode resultar numa diminuição de 40% do valor calórico do produto (DOSSIÊ EDULCORANTES, 2013). Além disso, o xilitol apresenta características adicionais que favorecem sua utilização como ingrediente alimentar, como calor negativo da solução causando assim sensação de "frescor" ao entrar em contato com a saliva, por não sofrer reação de Maillard que é responsável pelo escurecimento e redução do valor nutricional das proteínas, e, adicionalmente, por melhorar a cor e o sabor das preparações sem causar alterações indesejadas nas propriedades durante armazenamento (RIVAS et al., 2007).

O xilitol é um açúcar-álcool penta-hidroxilado ($C_5H_{12}O_5$) que ocorre naturalmente em frutas e vegetais, como ameixas, morangos, couve-flor e abóbora, em baixas concentrações (UR-REHMAN et al., 2015). Possui peso molecular de 152,15 g/mol (SALLI et al., 2019), e é amplamente utilizado como adoçante na indústria de alimentos (SATO et al., 2016). Adicionalmente, além de ter o poder edulcorante semelhante ao da sacarose (RIVAS et al., 2007),

apresenta propriedade antioxidante, crioprotetora e estabilizante (MOHAMAD et al., 2015).

Por ser um adoçante natural, é encontrado em processos do metabolismo humano, não havendo evidências de danos à saúde (PEREIRA, 2002). No entanto, sua ingestão excessiva está associada a sintomas digestivos, como flatulência, inchaço, fezes moles e diarreia, sintomas estes que tendem a desaparecer com a interrupção do consumo JANKET et al., 2019; SALLI et al., 2019).

A incorporação deste poliol em alimentos é legalmente permitida, uma vez que é classificado pela Food and Drug Administration (FDA) como um aditivo do tipo GRAS (*Generally Regarded as Safe*) (MUSSATTO & ROBERTO, 2002). Apesar da Organização Mundial da Saúde (OMS) não estabelecer um limite para ingestão diária e a FDA indicar que seu consumo é permitido até atingir o adoçamento desejado, recomenda-se que seu consumo diário não ultrapasse 60g, evitando assim seu efeito laxativo (GRASSE, 2012).

Aproximadamente metade do xilitol consumido é absorvido pelo corpo, uma vez que é convertido no fígado em xilose, sendo posteriormente fosforilado, gerando a xilulose-5-fosfato, intermediário da via pentose-fosfato, para assim ser convertido em glicose, que é lentamente liberada na corrente sanguínea ou armazenada como glicogênio (SALLI et al., 2019). A substituição do grupo carbonila dos carboidratos por um grupamento álcool, dificulta a digestão deste adoçante, caracterizando assim sua baixa digestibilidade bem como a lenta liberação de glicose hepática, o que determina seu baixo índice glicêmico e insulínico (LIVESEY, 2003). Esta qualidade do xilitol é benéfica, especialmente para pacientes diabéticos ou com outros distúrbios nutricionais relacionados (DOSSIÊ EDULCORANTES, 2013), pois contribui com a manutenção de níveis estáveis de glicose (JANKET et al., 2019).

Assim como os demais polióis, o xilitol, apesar de ser lentamente digerido e metabolizado pelo ser humano, é relativamente fácil de ser fermentado no cólon (LIVESEY, 2003), sendo assim um substrato para a microbiota intestinal. Desta forma, sua incorporação na dieta é capaz de modificar a microbiota intestinal (UEBANSO et al., 2017). Sua ingestão estimula o crescimento e a

atividade de bactérias produtoras de butirato, metabólito que serve de fonte energética para os colonócitos, e que apresenta efeitos anti-inflamatório, antineoplásico, de reforço a barreira colônica e indução da diferenciação e geração de células imunes (SATO et al., 2016).

Adicionalmente, sua incorporação na dieta é capaz de melhorar a hiperlipidemia e prevenir o aparecimento de cárie (SODERLING et al., 2008; UEBANSO et al., 2017). Tais propriedades tornam esse adoçante uma boa opção para a substituição da sacarose. Seu caráter hipocalórico associado ao seu papel na regulação da glicose e na modulação da microbiota intestinal (SODERLING et al., 2008; UEBANSO et al., 2017) são características desejáveis quando nos referimos a formulação de alimentos funcionais. Além disso, suas propriedades tecnológicas tendem a garantir maior estabilidade e manutenção das propriedades nutricionais do produto elaborado (RIVAS et al., 2007; MOHAMAD et al., 2015).

3.3 SOBREVIVÊNCIA DE PROBIÓTICOS FRENTE ÀS CONDIÇÕES DE ESTRESSE

Antes que um probiótico possa começar a cumprir seu papel biológico, deve sobreviver a condições de estresse ambientais impostos durante o processamento de alimentos e em sua passagem pelo trato gastrointestinal (MILLS et al., 2011). Sendo assim, seu sucesso e sua capacidade em trazer benefícios à saúde do consumidor irá depender de sua habilidade em suportar as condições tecnológicas de processamento e gastrointestinais (MATHIPA & THANTSHA, 2015).

Os fatores de estresse no processamento de alimentos incluem temperaturas extremas, alterações no pH, bem como tensões osmóticas, oxidativas e da matriz alimentar (MILLS et al., 2011; CHEN et al., 2017). Além disso, a passagem pelo sistema digestivo é uma jornada arriscada para qualquer bactéria, tanto pelos baixos níveis de pH encontrados no estômago, quanto pelas propriedades detergentes da bile no duodeno (MILLS et al., 2011).

Entre os fatores que mais agredem os probióticos durante o desenvolvimento do produto e após ingestão está a variação do pH. Por serem sempre encontradas em ambiente ácido, as bactérias ácido-láticas, dentre as quais está o gênero *Lactobacillus*, desenvolveram vários mecanismos para melhorar sua resistência a esse fator. Os quais envolvem: processos de neutralização, bomba de prótons e proteção e reparo de macromoléculas (WANG et al., 2017). No entanto, mesmo com esse aparato não há garantia de que o micro-organismo será capaz de sobreviver às condições adversas a serem enfrentadas.

Desta forma, visando aumentar os níveis de resistência dos probióticos, seja no processamento, armazenamento ou após consumo, tem-se investigado diferentes maneiras de proporcionar maior estabilidade microbiana. Dentre as estratégias utilizadas, está a submissão de culturas probióticas a níveis subletais, também chamada de pré-adaptação, pré-exposição ou seleção, uma vez que, em algumas circunstâncias, condições estressantes prévias podem ter efeito positivo na viabilidade e eficácia dos probióticos, especialmente se combinados com matrizes alimentares de suporte (SUMERI et al., 2010; WANG et al., 2017).

O pré-tratamento em condições de estresse pode conferir resistência e/ou melhorar a viabilidade de diferentes espécies de *Lactobacillus* (DE ANGELIS et al., 2001; KIM et al., 2001; DESMOND et al., 2002; DE ANGELIS et al., 2004; SAARELA et al., 2004; STREIT et al., 2008). Essa estratégia tem se tornado uma alternativa para aumentar a resistência de probióticos às condições gastrointestinais. Em 2015, Mathipa e Thantsha submeteram diferentes espécies de *Lactobacillus* a condições de estresse em que envolviam baixo pH e sais biliares. Após exposição, as células sobreviventes foram submetidas ao teste de simulação das condições gastrointestinais e os resultados demonstraram que a pré-exposição a fatores de estresse foi capaz de aumentar a resistência dos probióticos às condições gastrointestinais simuladas.

Essa resposta ocorre especialmente porque as células possuem mecanismos adaptativos que garantem sua defesa no combate a danos intracelulares ou no aumento de sua robustez para suportar ambientes externos

letais (MILLS et al., 2011). No entanto, ainda se faz necessário esclarecer as lacunas existentes entre a pré-exposição a fatores de estresse e o aumento da resistência celular, motivo esse que tem impulsionado trabalhos que visem investigar parâmetros que possam estimular mecanismos de defesa das células após serem expostas a condições limitantes.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 MICRO-ORGANISMO

A cultura comercial do probiótico *Lactobacillus rhamnosus* ATCC 7469 foi adquirida a partir da Plast Labor (Rio de Janeiro) na forma liofilizada. A manutenção da cultura foi a partir de cultivo em caldo Man, Rogosa e Sharpe (MRS) (Kasvi, Brasil) durante 24 horas a 37°C em estufa bacteriológica (LABOR). Em seguida, a suspensão celular foi semeada em meio MRS com ágar (20 g/L) e incubada novamente a 37°C, pelo mesmo período. Posteriormente, para promover sua preservação, as células foram ressuspendidas em glicerol 10% (v/v) e acondicionadas a -20 °C em freezer (FE 22, Electrolux), de acordo com a metodologia proposta por Chang e Liew (2012). A reativação do micro-organismo foi realizada em meio seletivo para *Lactobacillus*, durante 24 horas a 37 °C em estufa bacteriológica.

4.2 POLPAS DE MANGA, MARACUJÁ E GOIABA

As polpas de Manga (*Mangifera indica* L.), Maracujá Amarelo (*Passiflora edulis*) e Goiaba Paloma (*Psidium guajava* L.), foram adquiridas comercialmente no município de Igarassu, Região Metropolitana do Recife, Pernambuco, Brasil (-7.842743, -34.910525). De acordo com o fabricante, as polpas de manga são preparadas utilizando as variedades Espada e/ou Tommy. As mesmas foram armazenadas à -20°C (FE 22, Eletrolux).

4.3 FORMULAÇÃO DOS MEIOS DE CULTURA

A preparação do meio MRS, considerado grupo controle, foi realizada de acordo com especificação do fabricante, o qual foi, em seguida, esterilizado em autoclave durante 15 minutos a 121 °C. O caldo MRS, cuja concentração utilizada foi 54,4 g/L (conforme fabricante) era composto de (em g/L): Peptona (10); Extrato de carne (10); Extrato de Levedura (5); Glicose (20), Citrato

tiamônico (2); Acetato de sódio (5); Sulfato de magnésio (0,2) e Fosfato dipotássico (2).

Os meios de cultura à base das frutas foram preparados com 55 % (v/v) de polpa e em seguida pasteurizados. O processo de pasteurização lenta foi realizado em banho-maria, durante 35 minutos a 67 ± 2 °C, com posterior resfriamento em banho de gelo (FELLOWS, P.J., 2009; MADIGAN et al., 2010, FARIAS et al., 2016; SANTOS et al., 2017). O pH de todos os meios de cultura foi ajustado com NaOH (2M) ou HCl (2M) quando necessário.

4.4 MÉTODOS ANALÍTICOS

4.4.1 Caracterização das polpas

A caracterização das polpas de manga, maracujá e goiaba foi realizada no Laboratório de Bromatologia no Centro Acadêmico da UFPE em Vitória de Santo Antão. As determinações dos sólidos solúveis totais (°Brix), Vitamina C, acidez titulável, cinzas, umidade e proteínas foram realizadas de acordo com o Instituto Adolfo Lutz (IAL, 2008). Para cinzas utilizou-se o método de incineração em Mufla a 550 °C, para umidade foi realizada dessecação por secagem direta em estufa a 105°C e a análise físico-química para proteínas foi feita através do método de Kjeldahl. Por sua vez, a determinação dos lipídeos ocorreu por meio do protocolo Bligh-Dyer (1959).

4.4.2 Determinação da viabilidade celular

A viabilidade celular foi realizada pela técnica *spread-plate*. Sempre que necessário as amostras foram diluídas serialmente em solução salina (0,9 % p/v). Um volume de 100 μ L de cada diluição foi semeado em placas de Petri contendo o meio MRS acrescido de ágar (20 g/L), as quais foram incubadas a 37 °C, durante 48 horas em estufa bacteriológica (LABOR). É válido salientar que o número de vezes que cada amostra foi diluída variou de acordo com o tipo de meio em questão e a etapa do estudo para o processo de produção.

4.4.3 Determinação do pH

A medição do pH foi realizada em pHmetro de bancada (Gehaka, PG200). Para calibração do equipamento foram utilizadas Solução Tampão (Buffer) pH 7 $\pm$ 0,02 (Dinâmica) e Solução Tampão (Buffer) pH 4 $\pm$ 0,02 (Dinâmica) ou Solução Tampão pH 10,00 de Ácido Bórico/Cloreto de Potássio (NEON). O aparelho foi utilizado para realização dos ajustes de pH durante a formulação dos meios de cultivo (item 4.3), bem como no transcorrer do teste de simulação gastrointestinal (item 4.8). Além disso, foi utilizado durante o estudo de estoque refrigerado, para acompanhar a estabilidade do pH nos produtos avaliados.

4.4.4 Quantificação das concentrações de glicose, frutose e ácido lático por CLAE

A quantificação das concentrações de glicose, frutose e ácido lático nos meios fermentados foi realizada por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE). Para isso, as amostras foram centrifugadas a 6.720 g em microcentrífuga KASVI (K14-1215, Brasil) durante 15 minutos. Em seguida, o sobrenadante foi diluído e filtrado em membrana millipore de 0,22 μ m. A quantificação de glicose e frutose foi realizada com detector de índice de refração (RI), coluna de troca iônica com 300 milímetros x 7,8 milímetros e 9 μ M de tamanho de partículas (Aminex[®] HPX87H+, BioRad, EUA) e 60 °C. A fase móvel foi uma solução aquosa de ácido sulfúrico (5 mM) e o fluxo foi de 0,6 mL/min. A quantificação da concentração do ácido lático foi realizada com a mesma coluna e fase móvel descritas para quantificação dos carboidratos, porém, a temperatura foi 35 °C, o fluxo 0,5 mL/min e o detector utilizado foi o de arranjo de diodos (DAD). O equipamento possui uma bomba quaternária, degaseificador, forno para controlar a temperatura da coluna e injetor automático. O software utilizado para a obtenção dos dados foi o LC Solutions, fabricado pela Shimadzu Corporation (Kyoto, Japão).

4.4.5 Determinação de açúcares redutores totais

Os teores de açúcares redutores totais (ART) foram obtidos pelo método do ácido dinitrosalicílico (DNSA), segundo Miller (1959). Dessa forma, para determinação da concentração, 1 mL da amostra foi alocado em tubo de ensaio e os carboidratos nela contidos foram hidrolisados com 1 mL de HCl concentrado a 67 °C durante 7 minutos, com posterior banho em gelo. Em seguida, a mistura

foi neutralizada com NaOH (6 M), utilizando fenolftaleína como indicador. Após hidrólise ácida, 0,5 mL do hidrolisado foi adicionado em um novo tubo de ensaio contendo 1 mL de DNSA. A mistura foi aquecida a 100 °C por 5 minutos e posteriormente resfriada em banho com gelo. Para realizar a leitura da absorbância a 540 nm em espectrofotômetro (Gehaka, VIS-200G) foram adicionados 20 mL de água destilada nas amostras.

4.5 ESTUDO DO CRESCIMENTO DE *L. rhamnosus* ATCC 7469 NOS SUCOS DE MANGA, MARACUJÁ E GOIABA

Com o propósito de investigar a capacidade de crescimento do probiótico em diferentes meios vegetais elaborados a partir das polpas de Manga, Maracujá e Goiaba, foram realizadas fermentações cujo pH inicial foi ajustado para $6,00 \pm 0,2$ (NaOH, 2 M). Este pH foi escolhido, uma vez que espécies pertencentes ao gênero *Lactobacillus* são acidúricas, com pH ótimo para crescimento entre 5,5 e 6,2 (DE MACEDO et al., 2008). Assim como especificado no item 4.3, o meio MRS foi utilizado como controle.

As fermentações, no meio padrão e nos meios de fruta foram realizadas após reativação celular descrita no item 4.1. Para isso, foram adicionadas 10 % v/v da suspensão microbiana, reativada em MRS, em 90 mL de meio. As fermentações foram realizadas em Erlenmeyers de 250 mL durante 24 horas à 37 °C. No decorrer do processo de fermentação foram acompanhados os seguintes parâmetros em intervalos de 6 horas: viabilidade (Item 4.4.2), pH (Item 4.4.3), consumo de glicose e frutose e produção de ácido lático (Item 4.4.5).

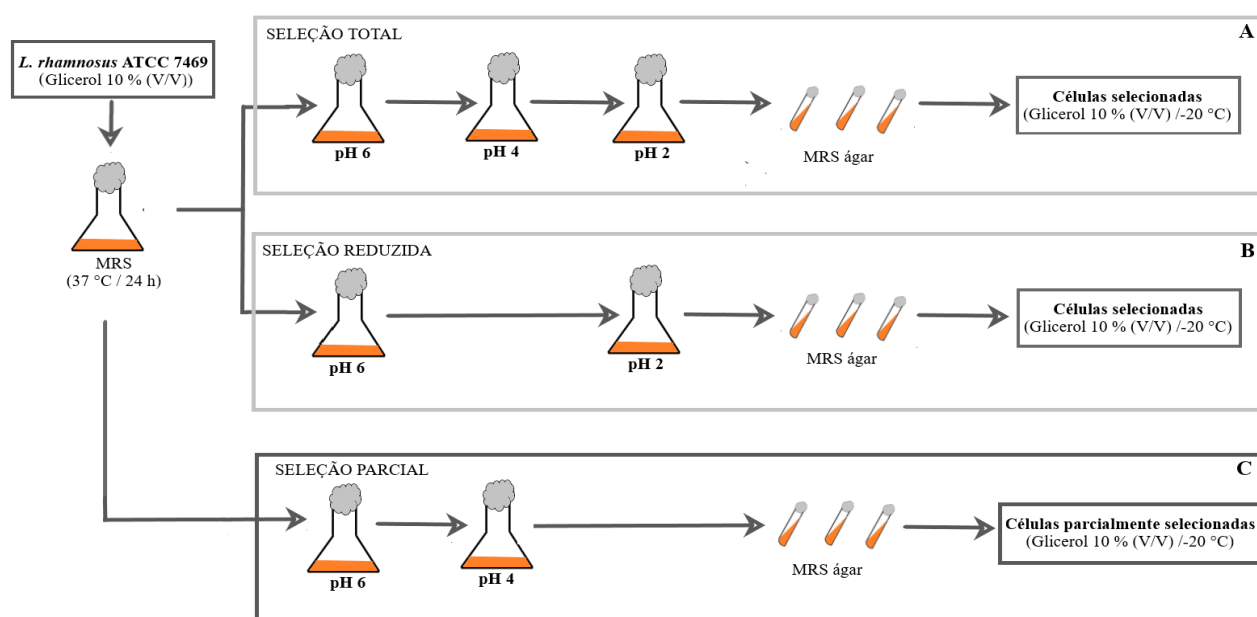
4.6 FERMENTAÇÕES EM CONDIÇÕES DE ESTRESSE ÁCIDO

Para obter células mais resistentes às condições gastrointestinais simuladas foram realizadas fermentações sucessivas com diminuição gradativa do pH dos meios de cultura. Foram utilizados tanto o meio considerado padrão para o crescimento de *L. rhamnosus* (MRS), quanto os meios à base das polpas de frutas. O pH de cada meio foi ajustado para $6,00 \pm 0,2$, $4,00 \pm 0,2$ ou $2,00 \pm$

0,2 com NaOH (2 M) ou HCl (2 M), quando necessário. A suspensão microbiana obtida após a primeira fermentação (pH 6) foi utilizada como inóculo (10 % v/v) para a fermentação seguinte (pH 4). Da mesma forma, o inóculo, também de 10 % v/v, para a terceira fermentação (pH 2) foi da suspensão microbiana obtida da fermentação com o pH ajustado para 4 (Figura 1a). Este procedimento foi denominado de gradiente total.

Por sua vez, com o propósito de verificar a influência do gradiente na obtenção de células mais resistentes, um segundo grupo experimental foi criado e denominado de gradiente reduzido (r). Neste caso, não houve a fermentação com o pH do meio ajustado para 4 (Figura 1b). Um terceiro procedimento também foi adotado e recebeu o nome de seleção parcial (Figura 1c), uma vez que ocorreu sem a etapa da fermentação com o pH do meio ajustado para 2. Esta condição foi adotada apenas para os casos em que *L. rhamnosus* ATCC 7469 não se manteve viável em meio com pH 2.

Figura 1. Processo para a seleção em gradiente ácido total (A) e reduzido (B) de *Lactobacillus rhamnosus* ATCC 7469. A seleção parcial (C) foi considerada apenas nos casos em que o probiótico não se manteve viável no pH 2.



Fonte: A autora (2021).

Todas as fermentações, independente do pH, foram mantidas em estufa bacteriológica a 37 °C (LABOR). Quando realizadas em meio MRS, cada fermentação em estresse ácido teve duração de 24 horas. Por sua vez, com base nos resultados observados em meio padrão, o tempo de fermentação foi reavaliado. Dessa forma, as fermentações realizadas nos meios vegetais tiveram duração de 24 horas quando pH inicial foi 6, e 12 horas quando o pH inicial do meio foi 4 ou 2. No decorrer desse processo, amostras foram retiradas em intervalos de tempo pré-definidos para que fossem avaliados a viabilidade celular (item 4.4.2), pH (item 4.4.3), glicose, frutose e ácido lático (item 4.4.5). A determinação da viabilidade foi realizada em triplicata e, as demais análises, em duplicata. Amostras com as células selecionadas foram submetidas ao teste de simulação das condições gastrointestinais (TSGI) (item 4.8). As fermentações foram denominadas de acordo com o meio, o pH utilizado e o tipo de seleção, gradiente total (t) ou gradiente reduzido (r) (Tabela 1).

Tabela 1. Siglas e condições das fermentações realizadas no meio padrão (MRS) e nos meios à base de polpa de manga, maracujá e goiaba. As letras t e r, correspondem ao tipo de seleção ácida realizada, ou seja, seleção total e reduzida, respectivamente. As fermentações realizadas em pH 4 correspondem a seleção parcial.

Fermentação	Meio	pH	Tempo (h)
MRS6	MRS	6	24
MRS4	MRS	4	24
MRS2t	MRS	2	24
MRS2r	MRS	2	-
MGA6	Manga	6	24
MGA4	Manga	4	12
MGA2t	Manga	2	12
MGA2r	Manga	2	12
MJA6	Maracujá	6	24
MJA4	Maracujá	4	12
MJA2t	Maracujá	2	12
MJA2r	Maracujá	2	12

GBA6	Goiaba	6	24
GBA4	Goiaba	4	12
GBA2t	Goiaba	2	12
GBA2r	Goiaba	2	12

Fonte: A autora (2021).

4.6.1 Determinação da velocidade específica máxima de crescimento para *L. rhamnosus*

Para determinar a velocidade específica máxima de crescimento no meio de cultura MRS, amostras de 1 mL foram retiradas a cada 6 horas, durante 24 horas de cultivo. As amostras foram diluídas antes da leitura da absorbância (570 nm) em espectrofotômetro (Gehaka, VIS-200G). A partir dos valores de absorbância e do tempo foi plotado gráfico no Excel® em escala logarítmica e ajustado um modelo linear, em que a inclinação da reta obtida correspondeu a velocidade específica máxima de crescimento (μ_{max}).

4.7 ELABORAÇÃO DOS SUCOS PROBIÓTICOS FERMENTADOS CONTENDO INULINA E XILITOL

Após a fermentação, foram adicionados inulina (5 g/L) e xilitol (10%) nos sucos probióticos. A concentração de trabalho para inulina foi selecionada levando em consideração o estudo realizado por ANDRADE et al. (2019). Por sua vez, a concentração de xilitol foi estabelecida com o intuito de mimetizar o efeito da sacarose utilizado por SANTOS et al. (2017). Ambos os aditivos foram adquiridos comercialmente da empresa Roval Farmácia de manipulação (Recife, Brasil).

Para verificar a influência desses componentes sobre a estabilidade físico-química e microbiológica dos sucos fermentados, quatro condições foram elaboradas para cada suco: com adição de inulina (SI); com adição de xilitol (SX); com adição de inulina e xilitol (SIX) e ainda sem aditivos, chamado de suco controle (SC). Os sucos probióticos fermentados, elaborados conforme essas condições, foram mantidos em refrigerador (DC49A, Electrolux Super Freezer) por 60 dias a 4 °C. Durante este período foram medidos pH, viabilidade, ART, glicose, frutose e ácido láctico. A sobrevivência do probiótico ao teste de

simulação das condições gastrointestinais (item 4.8) também foi quantificada durante o estoque refrigerado.

Além desses parâmetros, foi calculada a sobrevivência microbiana nas condições de estoque. Para isso, a viabilidade celular foi levada em consideração e a partir disso calculou-se a sobrevivência em porcentagem (%) por meio das seguintes equações.

$$S(\%) = \frac{V2}{V1} \times 100 \quad (\text{Equação 1})$$

$$S(\%) = \frac{(V2 - V1)}{V1} \times 100 \quad (\text{Equação 2})$$

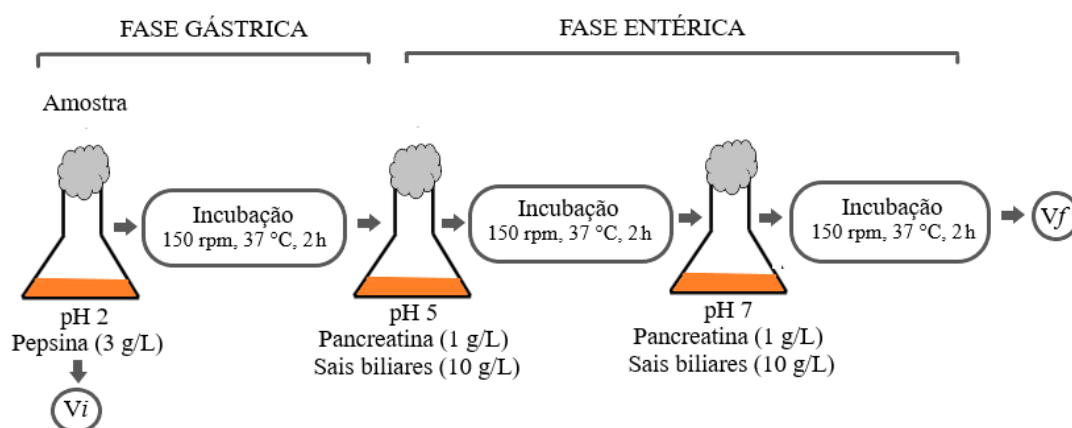
Nestes casos, V1 corresponde a viabilidade do momento anterior e V2 a viabilidade do momento seguinte. Para as situações em que foi observada morte celular, utilizou-se a Equação 1. Por outro lado, se o oposto foi observado, ou seja, houve aumento da viabilidade, utilizou-se a Equação 2. Por fim, para se ter uma melhor compreensão de todo o bioprocessamento, desde a obtenção do micro-organismo e das polpas até etapa final, foi criado um fluxograma, o qual pode ser observado no Apêndice A.

4.8 TESTE DE SIMULAÇÃO DAS CONDIÇÕES GASTROINTESTINAIS

A metodologia utilizada na presente etapa foi realizada de acordo com os trabalhos de Buriti et al. (2010) e Santos et al. (2017). A partir desta análise, avaliou-se a sobrevivência das células de *L. rhamnosus* ATCC 7469 ao teste de simulação das condições gastrointestinais (TSGI). No primeiro momento, para simular a fase gástrica, o pH da amostra (20 mL) foi ajustado para $2,0 \pm 0,2$ com HCl (2 M). Em seguida, foi adicionada uma quantidade de pepsina para que a concentração fosse 3 g/L. Após a adição da pepsina retirou-se uma alíquota para a realização das etapas para a determinação da viabilidade inicial (V_i). Em

seguida, o frasco contendo a amostra foi acondicionado em incubadora rotativa (TECNAL) (150 rpm, 37°C) por 2 horas (Figura 2).

Figura 2. Esquema do Teste de Simulação das Condições Gastrointestinais (TSGI). Viabilidade inicial (V_i); viabilidade final (V_f).



Fonte: A autora (2021).

Logo após a fase gástrica, as amostras foram direcionadas à fase entérica. Inicialmente, o pH foi ajustado para $5,0 \pm 0,2$ com solução alcalina (NaOH e $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) e, durante 2 horas, a amostra foi novamente incubada nas mesmas condições da etapa anterior. Após duas horas, o pH da amostra foi ajustado para pH 7,0 com a mesma solução alcalina, e, novamente, a amostra foi acondicionada nas mesmas condições por mais 2 horas. Durante toda a fase entérica, as concentrações de pancreatina e de sais biliares foram mantidas em 1 g/L e 10 g/L, respectivamente. Após as seis horas, foi retirada uma alíquota que seguiu para o procedimento da determinação da viabilidade final (V_f). A partir dos valores de viabilidade inicial e final, a taxa de sobrevivência (S) do *L. rhamnosus* foi determinada, em porcentagem, pela Equação 3:

$$S(\%) = \frac{V_f}{V_i} \times 100 \quad (\text{Equação 3})$$

4.9 ANÁLISE DE DADOS

Objetivando a realização das análises, os valores médios para viabilidade do micro-organismo foram obtidos por meio de triplicatas experimentais e as demais análises foram realizadas em duplicata. Os dados obtidos foram analisados para o teste de variância (ANOVA) e de Tukey a partir do programa Statistica (StatSoft) com nível de significância de 5 %. Os gráficos foram construídos no Excel ® e do programa Origin 8.0 ®. As Figuras foram criadas usando o Paint 3D ® (Microsoft Lift London).

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 COMPOSIÇÃO FÍSICO-QUÍMICA DAS POLPAS

A Tabela 2 apresenta a composição físico-química das polpas de manga, maracujá e goiaba. As letras minúsculas (a, b, c) iguais indicam que não houve diferença significativa entre os teores dos parâmetros das respectivas polpas.

Tabela 2. Composição físico-química das polpas de manga, maracujá e goiaba.

Composição	Polpas		
	Manga	Maracujá	Goiaba
Umidade (g/100 g)	87,61 ± 0,06 ^a	94,05 ± 0,04 ^b	92,26 ± 0,11 ^c
Cinzas (g/100 g m.s.)*	0,30 ± 0,01 ^a	0,53 ± 0,01 ^b	0,54 ± 0,08 ^b
Proteínas (g/100 g m.s.)*	0,48 ± 0,03 ^a	0,64 ± 0,01 ^b	0,37 ± 0,03 ^a
Lipídeos (g/100 g m.s.)*	0,05 ± 0,03 ^a	0,05 ± 0,00 ^a	0,03 ± 0,01 ^a
Sólidos solúveis totais (° Brix)	10 ± 0,00 ^a	10 ± 0,00 ^a	8 ± 0,00 ^b
Acidez titulável (g/ 100 g)	0,27 ± 0,00 ^a	2,11 ± 0,03 ^b	0,12 ± 0,03 ^c
Vitamina C (mg/ 100 g)	31,7 ± 0,00 ^a	28,17 ± 0,00 ^b	28,17 ± 0,00 ^b

*m.s. matéria seca

^{abc} letras iguais na horizontal não diferem significativamente ($\alpha \leq 0.05$) entre si.

Fonte: A autora (2021).

De acordo com a Instrução normativa nº 37, de 1º de outubro de 2018, do MAPA os sucos de manga e maracujá devem apresentar teores de sólidos solúveis em °Brix de no mínimo 11. Por sua vez, para o suco de goiaba o valor mínimo deve ser de 7. Levando isso em consideração, podemos constatar que após diluição das polpas para a produção das bebidas, apenas goiaba apresentou potencial de gerar um suco dentro deste parâmetro. No entanto, é válido ressaltar que o processo fermentativo, bem como a adição de componentes como a inulina e o xilitol podem aumentar o valor do °Brix, adequando assim os produtos dentro do estabelecido pelo MAPA.

Dentre as polpas avaliadas, é possível afirmar, a partir da análise da Tabela 2, que a polpa de maracujá apresentou maior valor de proteína e uma maior acidez. De acordo com Shori (2016), a composição nutricional das frutas, que envolve teores de açúcares, minerais, vitaminas, proteínas, fibras dietéticas

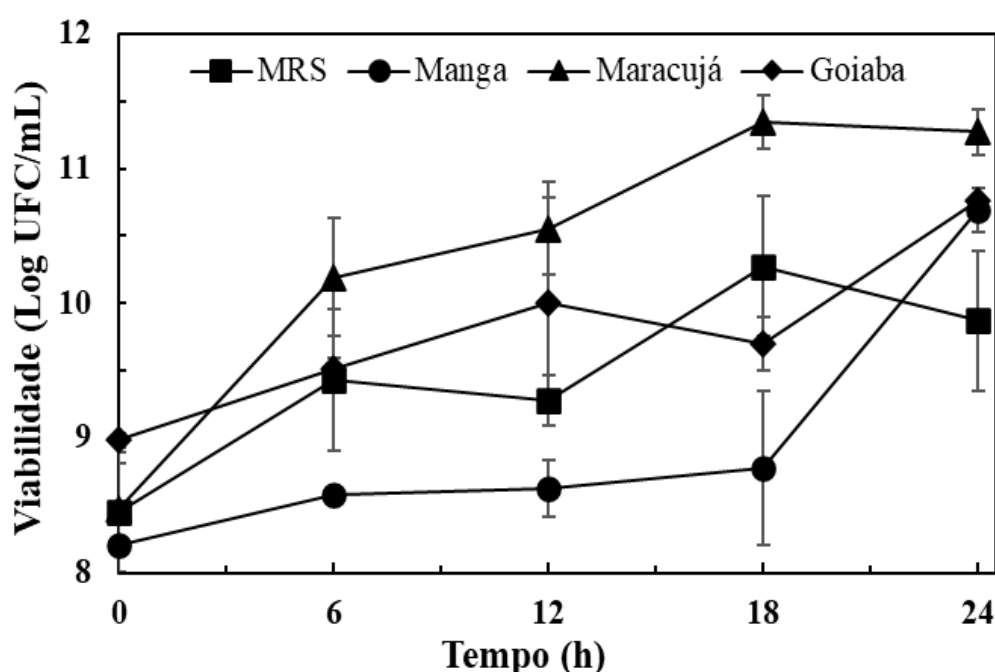
e antioxidantes têm efeitos importantes na viabilidade probiótica. Além disso, a presença de fatores antimicrobianos, a oxigenação e atividade de água também exercem influência sobre o micro-organismo (ACEVEDO-MARTÍNEZ et al., 2018).

Sendo assim, a composição nutricional da matriz alimentar exerce influência sobre o crescimento microbiano, bem como terá reflexo no seu desempenho ao longo do seu armazenamento. Desta maneira, antes de realizar a elaboração de bebidas funcionais à base de polpas se faz necessário investigar a composição nutricional dessas, com o intuito de garantir o melhor desempenho possível do probiótico em questão.

5.2 ESTUDO CINÉTICO DAS FERMENTAÇÕES REALIZADAS EM MEIOS DE CULTURA SEM ESTRESSE ÁCIDO

O crescimento do *L. rhamnosus* ATCC 7469 foi avaliado pela viabilidade celular durante as fermentações com o meio MRS e os meios dos sucos de manga, maracujá e goiaba (Figura 3). O pH inicial foi 6 nas quatro condições.

Figura 3. Viabilidade de *L. rhamnosus* durante as fermentações no meio padrão (MRS) e nos meios de cultura à base de polpa com pH inicial 6.



Fonte: A autora (2021).

Apesar de não haver diferença significativa entre as viabilidades iniciais das quatro condições, especialmente por partirem do mesmo inóculo, o crescimento no meio do suco de maracujá foi mais rápido até mesmo do que o observado em meio MRS, meio este comumente utilizado para o cultivo de bactérias ácido lácticas (CHANG & LIEW, 2012). Provavelmente, este comportamento de *L. rhamnosus* ATCC 7569 pode ser explicado pela composição físico-química da polpa de maracujá, refletindo assim o crescimento superior em relação aos meios de manga e goiaba (Tabela 2).

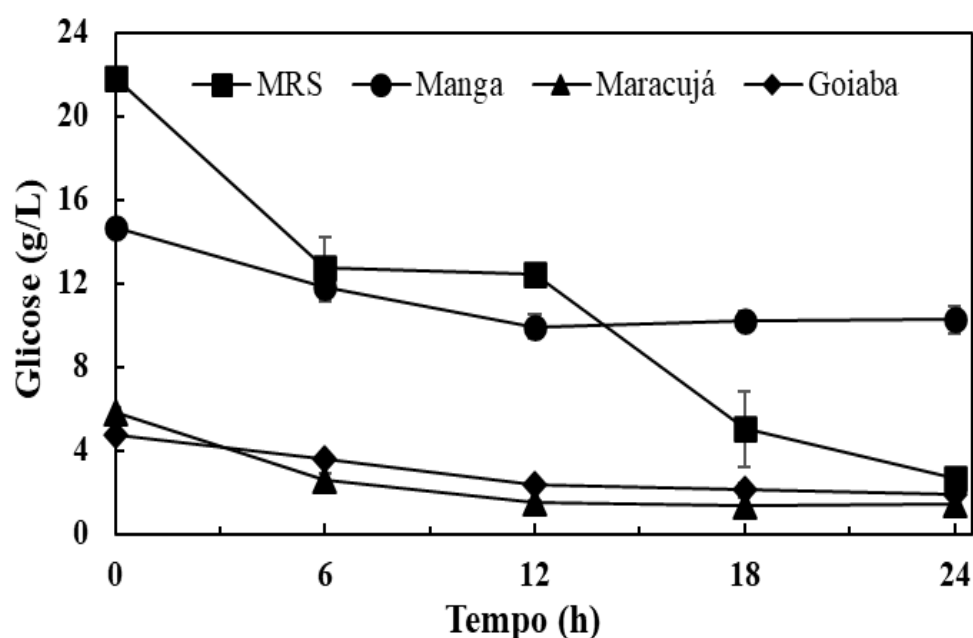
Dentre as polpas utilizadas, a de maracujá foi a que apresentou maior teor de proteínas. (Tabela 2), fator este que provavelmente potencializou o crescimento de *L. rhamnosus*. De acordo com Pimentel et al. (2019), proteínas e fibras dietéticas podem proteger células do estresse ácido, garantindo assim a manutenção da viabilidade probiótica. Segundo este mesmo autor, a alta morte de probióticos em sucos clarificados consiste principalmente pela ausência ou níveis insignificantes de proteína (PIMENTEL et al. 2019).

Na avaliação do crescimento nos meios dos sucos de manga e goiaba pode-se notar que o micro-organismo necessitou de mais 6 h para atingir sua viabilidade máxima. Portanto, as viabilidades máximas obtidas com 18 h (para o meio MRS e o meio do suco de maracujá) ou 24 horas (para os meios dos sucos de manga e de goiaba) geraram as seguintes velocidades máximas de crescimento celular: 0,16 Log UFC/mL.h⁻¹ (maracujá), 0,10 Log UFC/mL.h⁻¹ (MRS e manga) e 0,07 Log UFC/mL.h⁻¹ (goiaba). É importante salientar que apesar da viabilidade máxima nas fermentações dos meios MRS e do suco de manga terem sido observados com 18 e 24 horas, não existiu diferença significativa entre as produtividades máximas nestas duas condições de fermentação.

Observa-se ainda que as viabilidades celulares após 24 horas das fermentações nos sucos não apresentaram diferença significativa e foram maiores do que a viabilidade na fermentação do meio MRS, no mesmo tempo avaliado. Evidenciando assim a capacidade de crescimento e manutenção da viabilidade deste probiótico nos meios à base de fruta.

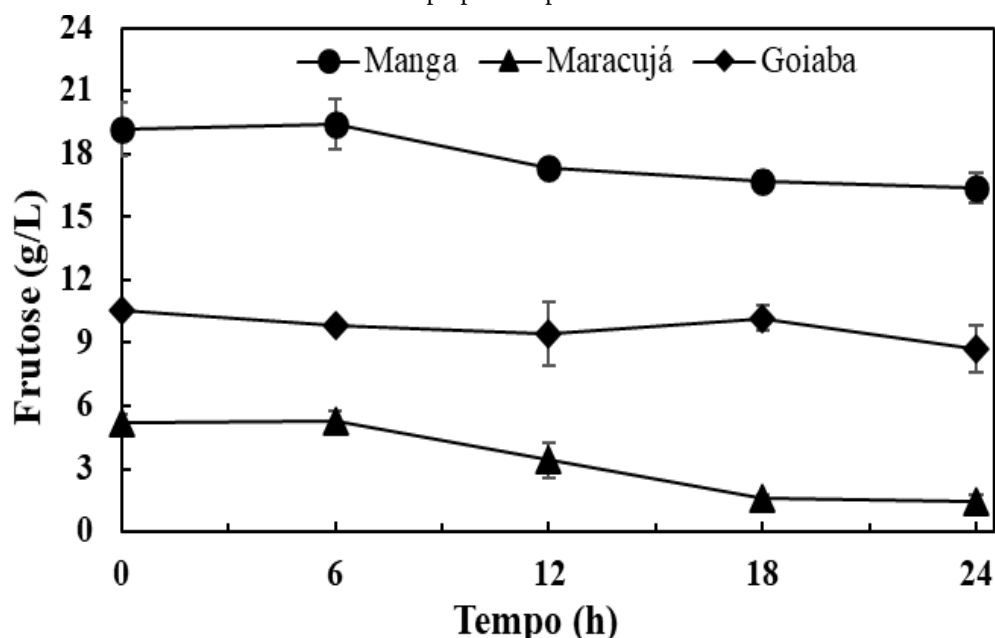
Nas Figuras 4 e 5 são apresentadas as concentrações de glicose e frutose, respectivamente durante o estudo cinético das fermentações. O meio MRS continha maior concentração inicial de glicose, quando comparado aos meios à base de polpa de fruta. Por outro lado, mesmo com menores concentrações iniciais, os meios dos sucos de frutas continham frutose, além da glicose.

Figura 4. Concentração de glicose nas fermentações realizadas por *L. rhamnosus* em meio padrão e nos meios à base de polpa com pH inicial 6.



Fonte: A autora (2021).

Figura 5. Concentração de frutose nas fermentações realizadas por *L. rhamnosus* nos meios à base de polpa com pH inicial 6.



Fonte: A autora (2021).

No meio do suco de manga a concentração inicial de glicose foi 60,4 % e 67,6 % superior do que nos meios de maracujá e de goiaba, respectivamente. Com relação à frutose, o meio de manga também apresentou maior concentração inicial de frutose, sendo esta 72,9 % e 45,1 % maior do que nos meios de maracujá e goiaba, respectivamente.

Levando em consideração somente a disponibilidade de carboidratos, esperava-se que o crescimento do probiótico fosse maior no meio à base de manga, seguido do meio de goiaba e do meio de maracujá. Entretanto, isso não foi observado, uma vez que a viabilidade em meio do suco de maracujá foi superior àquela alcançada nas outras fermentações, superando inclusive o crescimento observado no meio MRS (Figura 3).

O consumo de glicose nas fermentações dos sucos ocorreu até 12 horas, sendo de 32 %, 73 % e 50 %, nos meios do suco de manga, maracujá e goiaba, nesta ordem. Por outro lado, em MRS manteve-se durante todo o período avaliado, isto é, até 24 horas de cultivo, com consumo de aproximadamente 88 %.

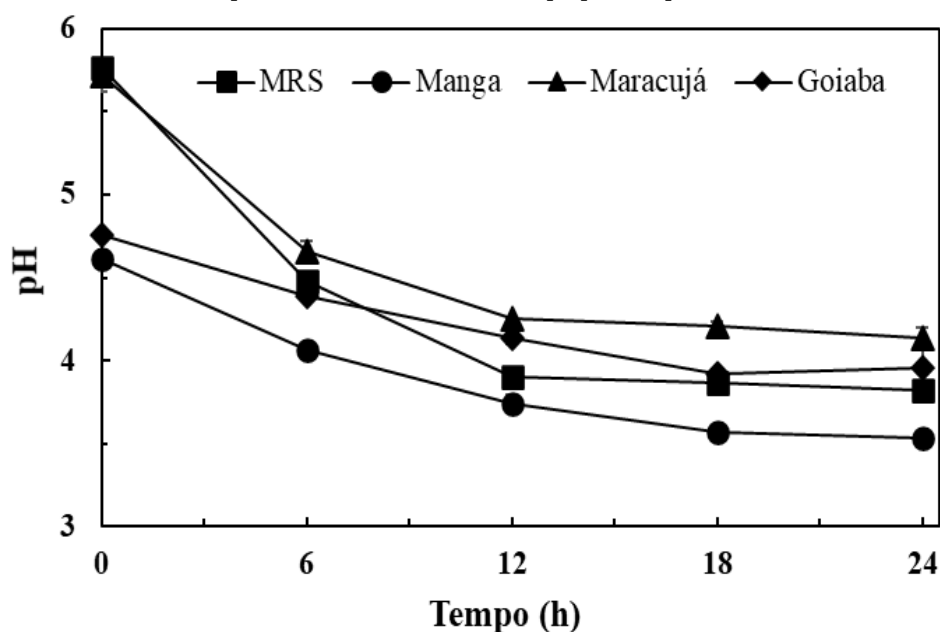
Por sua vez, para a frutose foi observado que o micro-organismo não utilizou esta fonte quando cultivado no meio do suco de goiaba, ou seja, não ocorreu consumo. Em meio de manga, *L. rhamnosus* metabolizou cerca de 10 % da frutose disponível. No meio do suco de maracujá foi onde ocorreu a maior assimilação de frutose, com consumo de 69 %. Sendo assim, tais resultados indicam que mesmo contendo a menor disponibilidade de carboidratos, o probiótico apresentou maior facilidade de assimilação de tais nutrientes quando disposto no meio à base de maracujá.

O desempenho metabólico de um micro-organismo vai além da necessidade de carboidratos no meio, e seu crescimento também depende de outros fatores nutricionais disponíveis, como vitaminas, minerais (SHORI, 2016) e proteínas (PIMENTEL et al., 2019). Apoiado nisso, podemos levar em consideração para tal discussão os fatores nutricionais estabelecidos para as polpas na Tabela 2.

Com base na composição físico-química das polpas de frutas (Tabela 2), a polpa de maracujá, além de ter apresentado o maior teor para proteína, também se destacou com relação às concentrações de lipídeos e cinzas quando comparado com as polpas de goiaba e manga, respectivamente. Sendo assim, esses resultados apontam que, além dos carboidratos, diferentes concentrações de proteínas, lipídeos e minerais em sucos de fruta influenciam o perfil de crescimento de *L. rhamnosus* ATCC 7469.

Na Figura 6 pode ser observado os valores do pH na fermentação do meio MRS e dos sucos de manga, maracujá e goiaba. É interessante notar, apesar do pH inicial dos quatro meios ter sido 6, que o pH no início das fermentações foi menor que esse valor. Isso pode ser atribuído à produção do ácido lático por *L. rhamnosus* durante sua reativação, o qual, após transferência do inóculo (10 % v/v), promoveu declínio do pH inicial nos meios que iriam ser fermentados.

Figura 6. Valores para o pH durante as fermentações realizadas por *L. rhamnosus* no meio padrão e nos meios à base de polpa com pH inicial 6.



Fonte: A autora (2021).

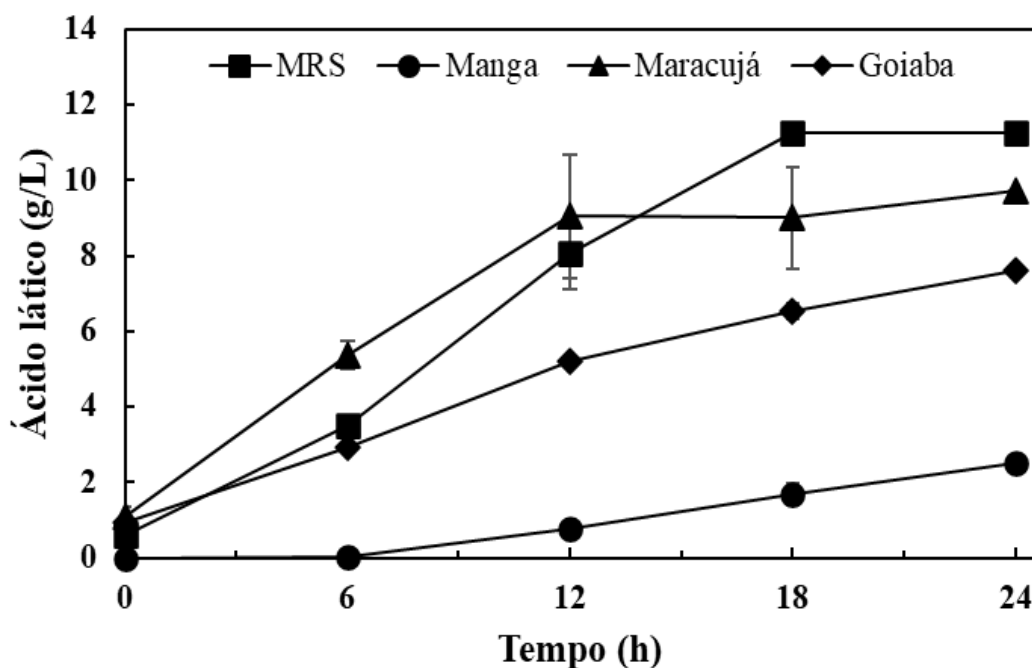
Nos meios dos sucos de manga e goiaba houve uma maior redução do pH inicial após adição do inóculo, 23,17 % e 20,67 %, respectivamente. Por sua vez, no meio MRS e à base de maracujá essa redução foi de 3,92 % e 4,67 %, respectivamente. Com base em tais resultados percebeu-se a existência de um efeito tampão no meio MRS e no suco de maracujá, uma vez que, diferentemente do observado para os meios de manga e goiaba, obtiveram menores reduções em seus pHs após adição do inóculo.

Gouveia (1999) investigou a capacidade tampão em sete sabores de sucos industrializados, dentre os quais estavam laranja, goiaba, abacaxi, pêssigo, manga, damasco e maçã. Em seu experimento, o autor observou que os sucos de manga e goiaba apresentaram a menor capacidade tamponante, assim como observado no presente trabalho. A habilidade de um suco resistir a mudanças no pH, ou seja, sua capacidade tampão, está relacionada com a quantidade de ácido titulável disponível em sua composição (PATUSSI, 2003). Sendo assim, ao relacionarmos a acidez titulável das polpas utilizadas no estudo atual (Tabela 2), conferimos que a polpa de maracujá apresentou o maior valor para este parâmetro, o que corrobora com seu maior efeito tamponante.

Após verificar os valores iniciais do pH, o perfil do pH ao longo das 12 horas de fermentação no meio padrão e nos meios de manga, maracujá e goiaba foi acompanhado. Nesse momento vale evidenciar que a variação em porcentagem do pH durante as fermentações levou em consideração os valores iniciais de cada meio e aqueles no momento em que esse parâmetro alcançou a estabilidade. Para o meio padrão a variação estabelecida levou em consideração a média do pH inicial ($5,77 \pm 0,04$) e a média do pH obtido após 12 horas de cultivo ($3,91 \pm 0,05$). Para os meios de manga, maracujá e goiaba as médias dos pHs iniciais foram $4,61 \pm 0,03$, $5,72 \pm 0,10$ e $4,76 \pm 0,03$, nessa ordem. Consecutivamente, os pHs considerados para calcular a variação foram obtidos após 18 horas em meios de manga ($3,57 \pm 0,01$) e 12 horas de fermentação nos meios de maracujá ($4,25 \pm 0,00$) e goiaba ($4,14 \pm 0,04$). Com base nisso, verificamos que o decaimento deste parâmetro foi maior na fermentação do meio MRS (32%), seguido das fermentações dos meios de maracujá (26%), manga (22,5%) e goiaba (13%).

A Figura 7 apresenta a concentração do ácido láctico durante as fermentações.

Figura 7. Concentração do ácido láctico durante as fermentações realizadas por *L. rhamnosus* no meio padrão e nos meios à base de polpa com pH inicial 6.

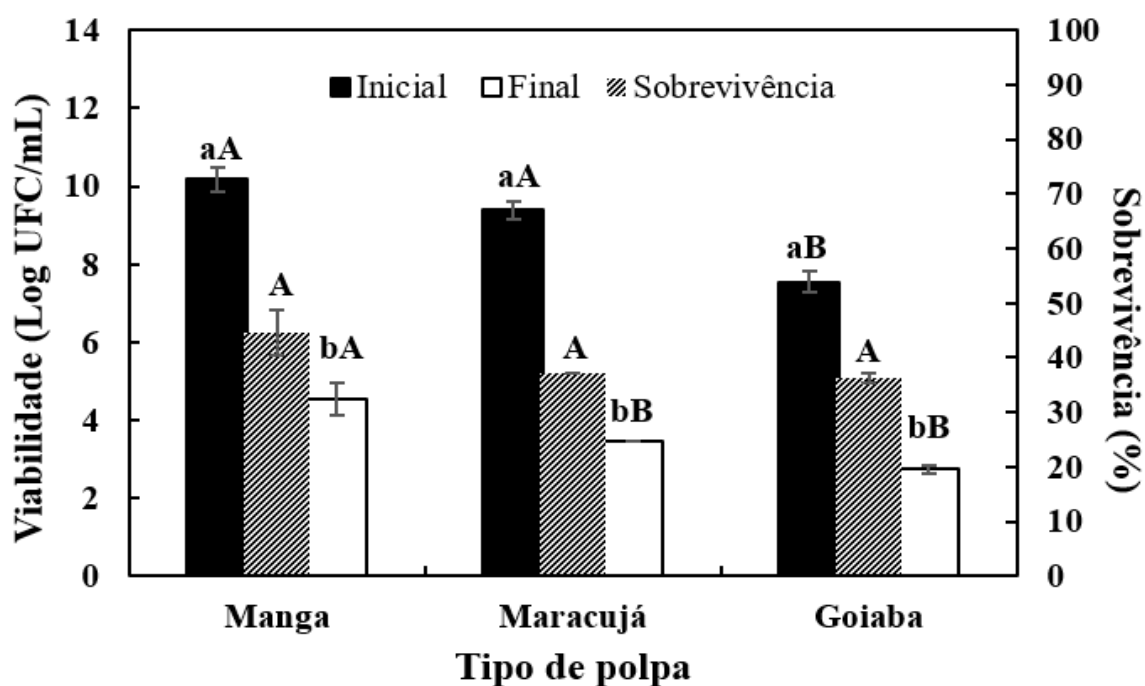


Fonte: A autora (2021).

A maior produção de lático foi obtida na fermentação do meio MRS, com o valor máximo alcançado com 18 horas de cultivo. Por outro lado, nas fermentações dos sucos de manga, maracujá e goiaba, 24 horas foi o tempo necessário para que ocorresse a produção máxima. A maior produtividade volumétrica máxima foi obtida em meio MRS (0,59 g/L.h), seguido da fermentação do suco de maracujá (0,36 g/L.h) e dos meios dos sucos de goiaba e manga, 0,28 e 0,10 g/L.h, respectivamente.

Amostras com 24 horas de cultivo foram utilizadas para a determinação da sobrevivência do *L. rhamnosus* nas condições gastrointestinais simuladas. A Figura 8 apresenta as viabilidades inicial e final do micro-organismo, além das respectivas sobrevivências. As células cultivadas em meio MRS não sobreviveram às condições simuladas e, por isso, não foram consideradas na elaboração do gráfico da Figura 8.

Figura 8. Viabilidades celulares inicial e final e sobrevivência do *L. rhamnosus* ATCC 7469 em condições gastrointestinais simuladas. Diferentes letras minúsculas indicam que os valores diferem significativamente ($\alpha \leq 0.05$) para a polpa; diferentes letras maiúsculas indicam que os valores diferem significativamente ($\alpha \leq 0.05$) entre as polpas.



Fonte: A autora (2021).

Com base nos resultados obtidos para as condições gastrointestinais simuladas, foi observado que *L. rhamnosus* ATCC 7469 sobreviveu nos meios formulados a partir das três polpas de fruta. No entanto, o mesmo não ocorreu em meio padrão. Nesta condição o micro-organismo apresentou viabilidade inicial de 8,87 Log UFC/mL, no entanto, as células não foram capazes de se manterem viáveis após as 6 horas do teste.

A habilidade de um probiótico sobreviver ao TSGI parece ser influenciada por aspectos como o tipo de meio em que o teste está sendo realizado, a linhagem do micro-organismo e a metodologia aplicada. Em um trabalho recente, pesquisadores verificaram que *L. plantarum* SI-1 e *L. pentosus* MU-1 apresentaram viabilidades de 10 Log UFC/mL e 11 Log UFC/mL, respectivamente, após serem submetidos a simulação gastrointestinal em MRS (YUASA et al., 2020). Diferentemente do realizado no estudo atual, *L. plantarum* SI-1 e *L. pentosus* MU-1 foram submetidas a pH 3 durante fase gástrica, fator este que pode gerar maior sobrevivência probiótica, quando comparado ao pH 2. A ausência de agitação, mimetizando assim os movimentos peristálticos, também pode ter influenciado os resultados de Yuasa et al. (2020). Com este exemplo, é possível refletir que a ausência de padronização para a simulação gastrointestinal tende a dificultar a realização de comparação entre espécies probióticas. Dessa forma, incentivamos a realização de investigações que visem estabelecer uma padronização metodológica para este teste, tornando assim a comparação de resultados mais eficientes.

Por sua vez, Andrade et al. (2019), que seguiram a mesma metodologia empregada no trabalho atual, observaram que a sobrevivência de *L. rhamnosus* ATCC 7469 foi inferior a 20 % em suco de goiaba (45% v/v) não fermentado. No nosso caso, além de termos utilizado uma maior concentração de polpa para elaboração do meio (55% v/v), a etapa de fermentação tornou o micro-organismo mais resistente às condições gastrointestinais simuladas, garantindo assim maior sobrevivência.

Um outro estudo, com o mesmo TSGI, desta vez realizado com maracujá da Caatinga, relatou que a sobrevivência de *L. rhamnosus* ATCC 7469 foi de aproximadamente 50% após fermentação em meio com 20% (v/v) de polpa

(SANTOS et al., 2017). Este valor foi cerca de 10 % superior ao aqui observado para o maracujá amarelo (Figura 8). Sendo assim, é possível apontar que a natureza da polpa também exerce influência sobre o metabolismo probiótico, sendo comum observar variações de sobrevivência microbiana de acordo com a fonte vegetal utilizada, mesmo sendo pertencente ao mesmo gênero.

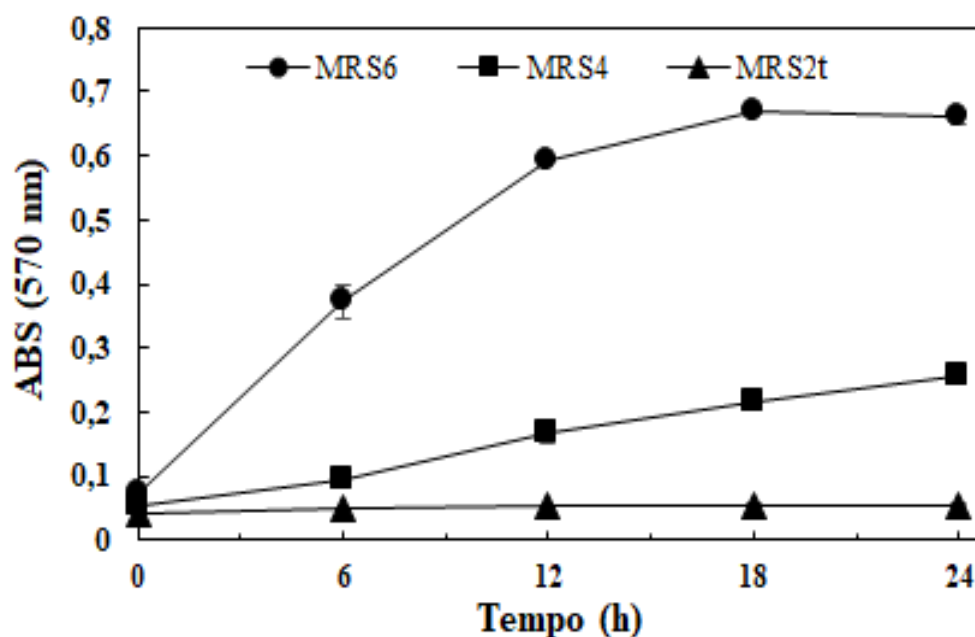
De acordo com a Figura 8 houve diferença significativa entre as viabilidades iniciais e finais nas três amostras e isso refletiu na sobrevivência, que foram inferiores a 100%. Por outro lado, não houve diferença significativa entre os valores de sobrevivência, apesar da viabilidade inicial da amostra do suco de goiaba probiótico e fermentado ser significativamente diferente da viabilidade inicial das outras duas amostras. O que ressalta a importância do cálculo da sobrevivência na comparação das condições de fermentação.

5.3 ESTUDO CINÉTICO DAS FERMENTAÇÕES REALIZADAS EM MEIOS DE CULTURA COM ESTRESSE ÁCIDO

5.3.1 Influência da acidificação do meio MRS sobre o crescimento de *Lactobacillus rhamnosus* ATCC 7469

A Figura 9 apresenta o perfil de crescimento para o micro-organismo durante as fermentações sucessivas do meio MRS com diminuição do pH inicial a cada novo cultivo. Após plotar os dados das absorbâncias no Excel®, a velocidade específica máxima foi determinada ($\mu_{\text{máx}}$), sendo essa correspondente ao coeficiente angular das equações geradas. Dessa forma, foi possível observar que a fermentação em MRS com pH 6, o micro-organismo apresentou velocidade específica máxima de crescimento, $\mu_{\text{máx}}$, de $0,21 \text{ h}^{-1}$. Por outro lado, as células transferidas do MRS6 para o MRS4 cresceram mais lentamente com $\mu_{\text{máx}}$ igual a $0,10 \text{ h}^{-1}$.

Figura 9. Curva de crescimento do *Lactobacillus rhamnosus* durante fermentações em meio MRS com diminuição sucessiva do pH.



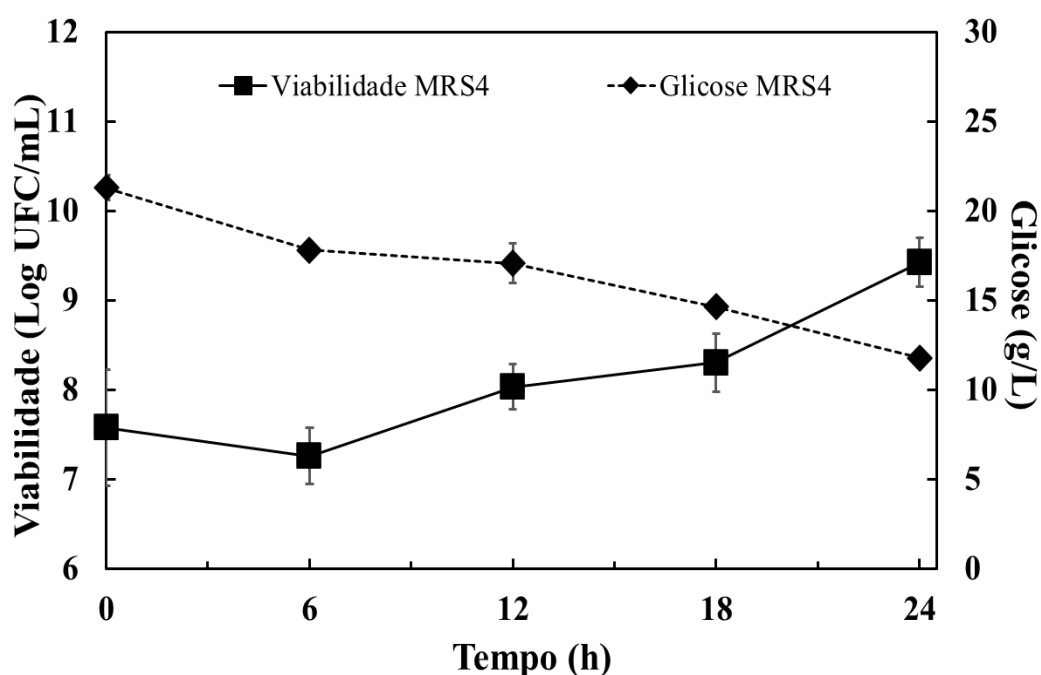
Fonte: A autora (2021).

Subsequentemente, foi observado que as células transferidas do MRS4 para o MRS2t não apresentaram crescimento durante o período de observação, com queda da absorbância para zero após 6 horas de cultivo, e por isso, não foi possível determinar μ_{max} nesta condição. Além da medida da absorbância também foram quantificadas a viabilidade e o consumo de glicose durante as fermentações do meio MRS em estresse ácido.

A viabilidade na fermentação com pH 6 alcançou valor máximo com 18 horas de cultivo, mantendo-se constante até 24 horas (fase estacionária) (Figura 3). Por sua vez, a viabilidade na fermentação subsequente (MRS4) apresentou máxima viabilidade com 24 horas de cultivo (Figura 10). Os valores de viabilidade obtidos estão de acordo com a indicação de crescimento observada pela medida da absorbância (Figura 9). É necessário ressaltar que a diferença na viabilidade inicial de *L. rhamnosus* observada em MRS6 e MRS4, foram decorrentes da etapa precedente que o micro-organismo foi submetido. As células cultivadas em MRS6 foram oriundas da etapa de reativação em meio padrão, por sua vez, as utilizadas no MRS4, foram transferidas do cultivo na condição MRS6.

Na sucessiva fermentação do meio com pH ajustado para 2 (MRS2t) houve decaimento a zero nas primeiras seis horas, como também indicado pela medida da absorbância (Figura 9). Visando estimar o tempo máximo de sobrevivência nesta condição, todo o procedimento de fermentações sucessivas foi repetido e amostras entre zero e seis horas foram retiradas durante a terceira fermentação (pH ajustado para 2). Sendo assim, observou-se que a viabilidade decaiu a zero após duas horas de cultivo nesta condição.

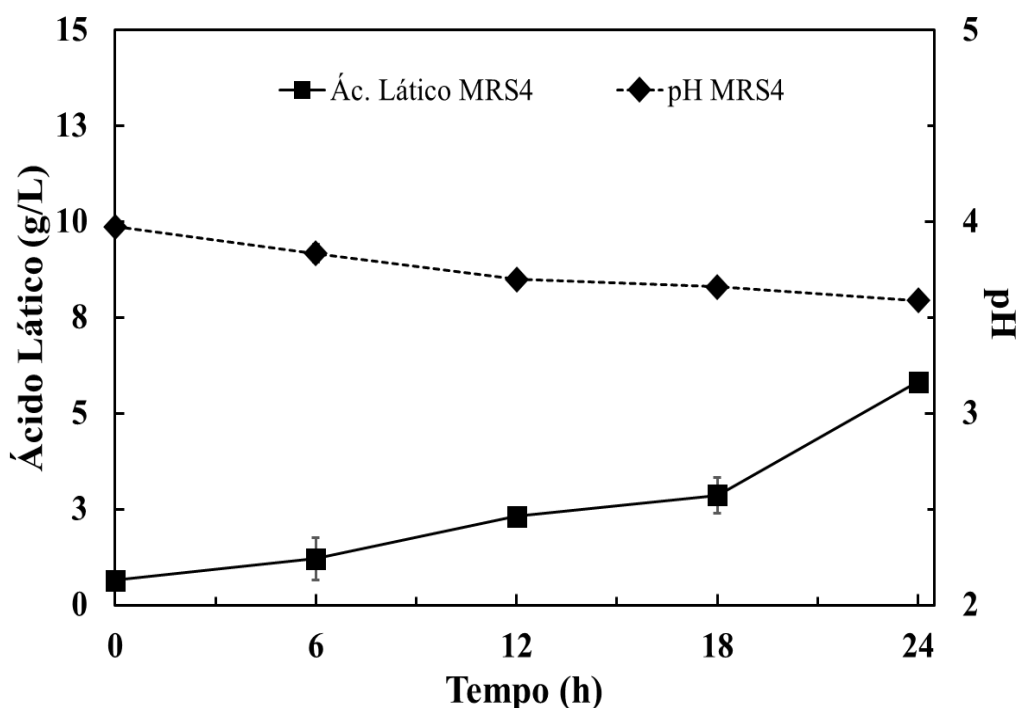
Figura 10. Viabilidade do *L. rhamnosus* e consumo de glicose durante as fermentações do meio MRS com pH ajustado para 4. A sigla MRS4 corresponde ao meio com pH inicial 4.



Fonte: A autora (2021).

Assim como realizado em MRS6 (Figura 6 e Figura 7), também foram medidos o pH e a concentração de ácido lático quando o pH inicial foi ajustado para 4 (MRS4) (Figuras 11). Devido a morte celular nas fermentações com pH inicial igual a 2 (MRS2t), esses parâmetros não foram representados nos gráficos.

Figura 11. Concentração de ácido láctico e pH durante as fermentações do meio MRS com pH ajustado para 4. A sigla MRS4 corresponde ao meio com pH inicial 4.



Fonte: A autora (2021).

No meio MRS6 o consumo de glicose foi 32,5 % maior do que no MRS4, o que está de acordo com o maior crescimento e, conseqüentemente, maior velocidade específica máxima de crescimento.

Quando o pH inicial do meio foi ajustado para 4 (MRS4), a diminuição ocorreu até 18 horas de fermentação com queda de aproximadamente 8%. Por outro lado, o pH decresceu 32% até 12 horas na fermentação do meio com pH inicial igual a 6 (MRS6). Esses dados ressaltam a influência do pH do meio de fermentação sobre a atividade metabólica de *L. rhamnosus* ATCC 7462.

A maior concentração do ácido láctico na fermentação MRS6 foi observada com 18 horas de cultivo, mantendo-se constante até 24 horas. Esta concentração foi maior do que a máxima concentração observada na fermentação MRS4, a qual foi observada com 24 horas. Logo, assim como o crescimento, a produção do ácido láctico também foi mais rápida na fermentação MRS6. Entretanto, vale ressaltar que houve crescimento, consumo de glicose e produção de ácido láctico na fermentação MRS4.

Um estudo publicado em 2018, avaliou a tolerância de *L. rhamnosus* à acidificação do meio MRS (ACEVEDO-MARTÍNEZ et al., 2018). Com base nos resultados obtidos, os autores verificaram que *L. rhamnosus* HN001 manteve sua viabilidade em torno de 8 Log UFC/mL após 24 horas em meio MRS com pH 4. De acordo com a discussão realizada pelos autores, aspectos como o teor de glicose no meio e a cepa utilizada, assim como seus mecanismos de proteção e reparo, influenciam na resistência ao pH ácido. Sendo assim, a atividade metabólica da linhagem ATCC 7469 em MRS4 pode ter sido resultado de mecanismos adquiridos adaptativamente, os quais garantiram crescimento nesta condição.

Sendo assim, as amostras contendo as células sobreviventes da segunda fermentação (MRS4) foram submetidas ao TSGI para verificar a influência da seleção parcial sobre a resistência microbiana ao teste. Entretanto, como previsto na terceira fermentação sucessiva, isto é, com o pH inicial do meio ajustado para 2 (MRS2t), houve decréscimo da viabilidade a zero ainda na fase gástrica (2 horas). O baixo teor de glicose, assim como a ausência de outras fontes energéticas, como frutose e sacarose, deve ter influenciado a resistência microbiana. Sendo assim, incentivamos investigações que visem estabelecer a relação entre teores de carboidratos e sobrevivência de *L. rhamnosus* ATCC 7469 ao TSGI, especialmente por ser um aspecto relevante no desenvolvimento de alimentos carregadores de probióticos.

5.3.2 Influência da acidificação dos meios dos sucos de frutas sobre a viabilidade de *Lactobacillus rhamnosus*

Nesta etapa do trabalho foram realizados estudos para a seleção de *L. rhamnosus* a partir dos meios formulados com polpas de frutas, manga – MGA (*Mangifera indica* L.), maracujá – MJA (*Passiflora edulis*) e goiaba – GBA (*Psidium guajava* L.).

Após cultivo e estudo do crescimento de *L. rhamnosus* ATCC 7469 em pH 6 (Item 5.2) realizou-se o acompanhamento da viabilidade, perfil de pH, concentrações iniciais e finais para glicose e frutose e produção de ácido lático nas três matrizes vegetais no pH 4 e no pH 2, nas fermentações sucessivas.

Antes de descrever os resultados obtidos vale a pena salientar, para maior compreensão, que nas fases com pH inicial ajustado para 4 e 2, o tempo de fermentação foi reduzido de 24 horas para 12 horas, devido ao maior estresse em tais condições. Esta alteração foi baseada tanto nos resultados obtidos durante a seleção em MRS quanto em testes preliminares realizados com os meios de polpa.

5.3.2.1 Fermentações sucessivas em Suco de manga

Os valores para a viabilidade, a glicose, a frutose e o pH durante fermentação com pH inicial igual à para 4 (MGA4), ou seja, a fermentação subsequente àquela do meio com o pH inicial ajustado para 6, estão expostos na Figura 12a.

A viabilidade diminuiu (18,06 %) nas primeiras duas horas de cultivo, mas manteve-se constante até o final do período avaliado. O consumo de glicose foi mais acentuado a partir de seis horas (16,3 %) e o de frutose a partir de duas horas (10,1 %). O pH manteve-se constante. A partir destes dados, pode-se afirmar que houve apenas manutenção celular.

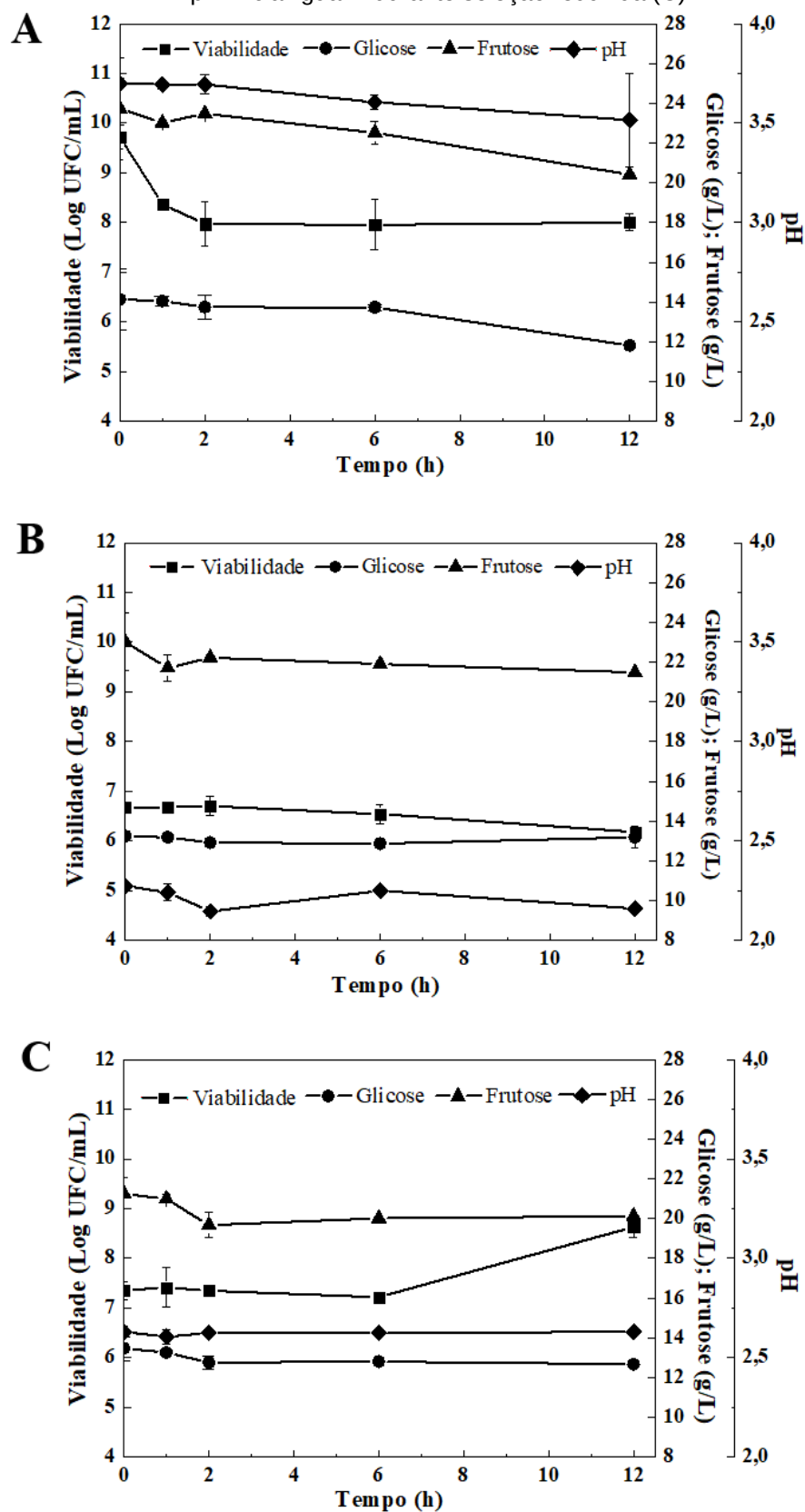
Consecutivamente, os mesmos parâmetros foram analisados para a seleção total (MGA2t) e para a seleção reduzida (MGA2r). Os dados para seleção em MGA2t foram obtidos a partir da transferência da suspensão microbiana crescida em pH 4 (Figura 12b). Por sua vez, para a seleção em MGA2r foram coletados após transferência da suspensão microbiana diretamente do meio a pH 6 para o meio a pH 2, isto é, sem a etapa de crescimento em meio com o pH ajustado para 4 (Figura 12c).

No meio MGA2t, *L. rhamnosus* manteve sua viabilidade constante, por volta de até 6 horas, apresentando uma discreta queda após esse período (8 %). O consumo de glicose foi praticamente nulo, com apenas 0,42%. Por outro lado, foi verificado para esta condição uma preferência pela frutose, com consumo de 6,6 % após o período de avaliação.

Assim como observado para MGA4, na condição atual também não houve produção de ácido láctico e o pH diminuiu apenas 5 %, ou seja, os carboidratos consumidos foram utilizados para a manutenção celular, sem haver crescimento

e consequentemente produção de ácido láctico. Após as 12 horas de cultivo verificou-se que, apesar da acidez do meio, *L. rhamnosus* teve uma sobrevivência de 93,23 %, valor este superior ao observado após as 12 horas de cultivo em MGA4, o que pode estar relacionado a ativação de mecanismo de proteção ao estresse ácido, como processos de neutralização, bomba de prótons e reparo de macromoléculas (WANG et al., 2017).

Figura 12. Viabilidade, concentração de glicose e de frutose e pH durante as fermentações em meio do suco de manga para a pH 4 (A), com pH inicial igual 2 durante seleção total (B) e com pH inicial igual 2 durante seleção reduzida (C).



Fonte: A autora (2021).

Por outro lado, no meio MGA2r, ou seja, na ausência da etapa intermediária (MGA4), houve aumento da viabilidade durante as 12 horas (16,2%). Houve consumo de 7,5 % para glicose, valor este superior ao observado em MRS2t. Adicionalmente observou-se consumo de 5,7 % da frutose disponível no meio nas 2 primeiras horas de cultivo. O pH manteve-se constante e não houve produção de ácido lático.

Esses resultados indicam que a depender do pH em que *L. rhamnosus* ATCC 7469 esteja exposto, para meio à base de manga, o seu perfil metabólico irá se moldar. A preferência entre o consumo de glicose e frutose e até mesmo o consumo de ambos os carboidratos pode estar refletindo um sistema de sobrevivência que ainda necessita ser elucidado, especialmente quando nos referimos à seleção de probióticos em meios acidificados formulados a partir de polpa de fruta.

Um outro aspecto que pode ter influenciado a resposta do micro-organismo quando expostos ao pH 2 pode ter sido o pH do meio precedente no qual probiótico foi cultivado. Uma vez que, células provenientes do pH 4 apenas se mantiveram em pH 2 e as vindas diretamente do meio com pH 6 apresentaram potencial para crescimento. O estresse ácido é considerado o fator mais prejudicial ao crescimento e viabilidade de espécies do gênero *Lactobacillus*, podendo assim promover alterações significativas nas propriedades da membrana celular, como hidrofobicidade e composição de ácidos graxos (HADDAJI et al., 2015), trazendo assim reflexo no desempenho probiótico.

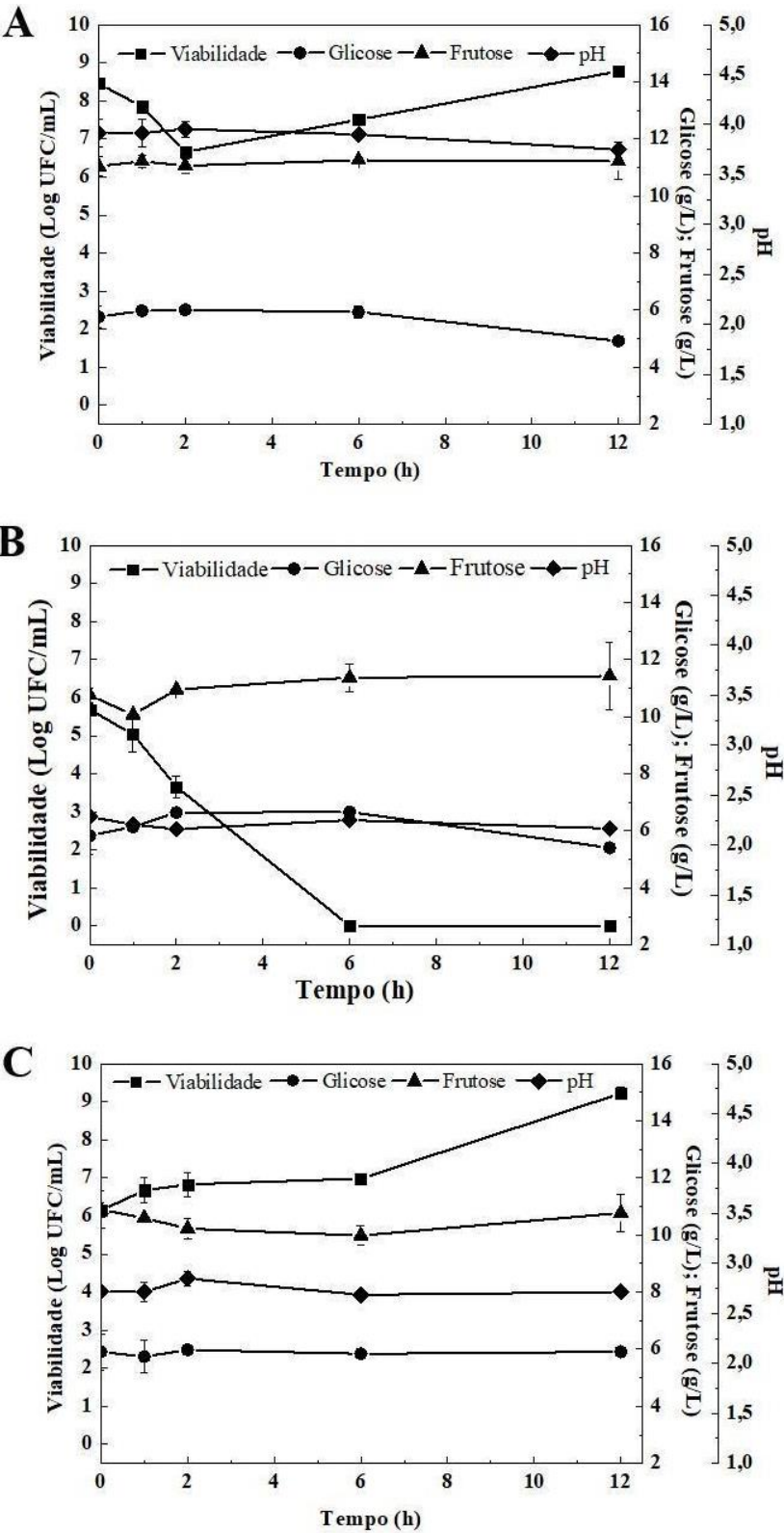
5.3.2.2 Fermentações sucessivas em Suco de goiaba

Após os estudos cinéticos realizados nos meios de manga, prosseguiu-se com a avaliação da seleção em gradiente ácido para o meio de suco de goiaba. Os resultados obtidos para a viabilidade, as concentrações de carboidratos e o pH em GBA4 podem ser observados na Figura 13a.

Nessa etapa, a viabilidade de *L. rhamnosus* ATCC diminuiu nas primeiras duas horas de cultivo (21,3%). Em contrapartida, após esse curto período, as células sobreviventes cresceram 32 % até o fim da fermentação. O consumo de glicose ocorreu de forma expressiva, especialmente após 6 horas de cultivo

(17%). Não foi observado consumo para a frutose e o pH apresentou pouca variação, diminuindo apenas 4,2%, devido à baixa produção do ácido láctico (0,24 g/L).

Figura 13. Viabilidade, concentração de glicose e de frutose e pH durante as fermentações em meio do suco de goiaba para a pH 4 (A), com pH inicial igual 2 durante seleção total (B) e com pH inicial igual 2 durante seleção reduzida (C).



Fonte: A autora (2021).

Ao compararmos o comportamento de *L. rhamnosus* em meio de manga (MGA4) (Item 5.3.2.1) e de goiaba (GBA4), ambos com pH inicial 4, podemos perceber que nos dois casos houve morte celular entre as duas primeiras horas. No entanto, após este período o micro-organismo, quando em meio de manga, utilizou os carboidratos disponíveis para manter sua viabilidade. Por outro lado, em meio de goiaba, após queda na viabilidade o micro-organismo direcionou seu consumo especificamente para a glicose, sendo capaz de crescer.

A Figura 13b mostra a seleção total em meio de suco de goiaba (GBA2t). Nessa condição, *L. rhamnosus* apresentou declínio em sua viabilidade até as 6 horas de cultivo, com morte celular total. Não foi verificado consumo de glicose e de frutose, nem produção de ácido láctico. O pH apresentou uma discreta queda (5,2%), provavelmente em decorrência da morte celular e ruptura da membrana plasmática com liberação do meio intracelular.

Por conseguinte, foi acompanhada a seleção em gradiente reduzido em suco de goiaba (GBA2r) (Figura 13c). Nessa etapa, observou-se crescimento (50,05%), apesar de não ter sido verificada diferença entre as concentrações de glicose e de frutose ao longo do processo. Foi quantificada a baixa produção de ácido láctico (0,08 g/L) e o pH manteve-se constante ao longo das 12 horas.

Ao contrário do observado em GBA2t, o crescimento de 50,2% das células em GBA2r está relacionado à ausência da etapa intermediária do pH 4 e a robustez das células vindas diretamente do pH 6. Desta forma, associado com observado no meio à base de manga, a etapa do pH 4 torna as células de *L. rhamnosus* mais vulneráveis ao estresse em pH 2 da etapa seguinte. Em todas as condições analisadas na polpa de goiaba, o carboidrato que esteve disponível em maior quantidade foi a frutose, apesar de não ter sido consumido a partir do pH 6.

Por sua vez, a menor concentração de glicose quando comparado com o meio de manga, influenciou a resistência do probiótico em GBA2t. Além das características genéticas do probiótico e o processamento a que foi submetido, o meio em que está inserido parece imprimir consequências no desempenho de *L. rhamnosus* ATCC 7469 quando em pH ácido. Corcoran et al. (2004) relataram que a resistência de *L. rhamnosus* GG ao estresse ácido depende do conteúdo

de glicose no meio. Segundo os autores, a glicose, por ser facilmente metabolizada, aumenta assim a disponibilidade do ATP intracelular permitindo a exclusão de prótons. Desta forma, a glicose, por ser uma fonte energética facilmente assimilada, pode auxiliar nos mecanismos celulares que buscam a homeostase do pH (ALONSO et al., 2014; ACEVEDO-MARTÍNEZ et al., 2018).

5.3.2.3 Fermentações sucessivas em Suco de maracujá

Por fim, o mesmo estudo foi realizado durante a seleção no meio de suco de maracujá. Os resultados para viabilidade, consumo de glicose e frutose, produção de ácido láctico e pH em MJA4 podem ser observados na Figura 14a.

No pH 4, a viabilidade apresentou um aumento de 3,5 % nas 12 horas de cultivo. O consumo de glicose e de frutose ocorreu de forma contínua durante todo o período de observação, com assimilação de aproximadamente 28 % e 14,3 %, respectivamente. A produção de ácido láctico foi de 1,8 g/L e o pH apresentou discreta redução ao longo da fermentação.

Após o cultivo em pH 4, seguiu-se para o estudo cinético da seleção em pH 2 gradiente total (MJA2t), cujo valores para viabilidade, consumo de carboidratos e pH estão representados na Figura 14b.

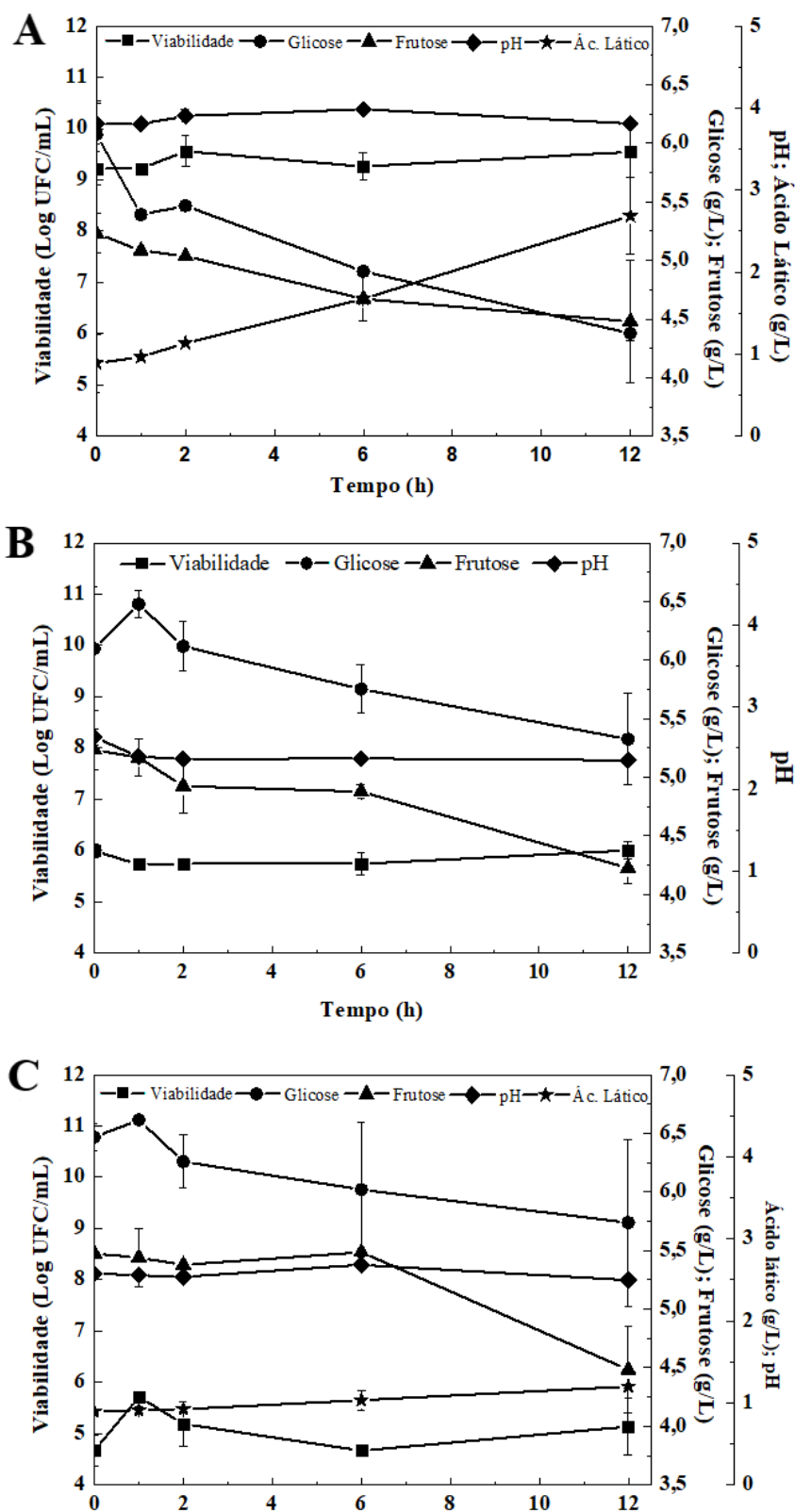
A viabilidade permaneceu constante durante todo o cultivo. Houve consumo de 14,6 % para a glicose durante as 12 horas. O consumo de frutose ocorreu mais expressivamente após as 6 horas de seleção, com assimilação de 19,3 % ao final do processo. Foram produzidas 0,02 g/L de ácido láctico, concentração esta que promoveu uma queda discreta no pH.

Na Figura 14c estão os dados obtidos durante o processo de seleção em gradiente reduzido realizado no meio de suco de maracujá (MJA2r). Nessa etapa, o micro-organismo apresentou aumento de aproximadamente 9,9 % em sua viabilidade durante as 12 horas de seleção. Houve consumo de 11,3 % para a glicose e 18,1 % para a frutose. Foram produzidos 0,3 g/L de ácido láctico e o pH do meio caiu 3,1 % durante esse processo fermentativo.

Tais dados nos mostram que na fase sem a etapa intermediária do pH 4, ou seja, na seleção reduzida, o micro-organismo apresentou um melhor

desempenho. Ou seja, além de crescer, produziu uma quantidade de ácido láctico 15 vezes superior do que o observado em MJA2t.

Figura 14. Viabilidade, concentração de glicose e de frutose e pH durante as fermentações em meio do suco de maracujá para a pH 4 (A), com pH inicial igual 2 durante seleção total (B) e com pH inicial igual 2 durante seleção reduzida (C).



Fonte: A autora (2021).

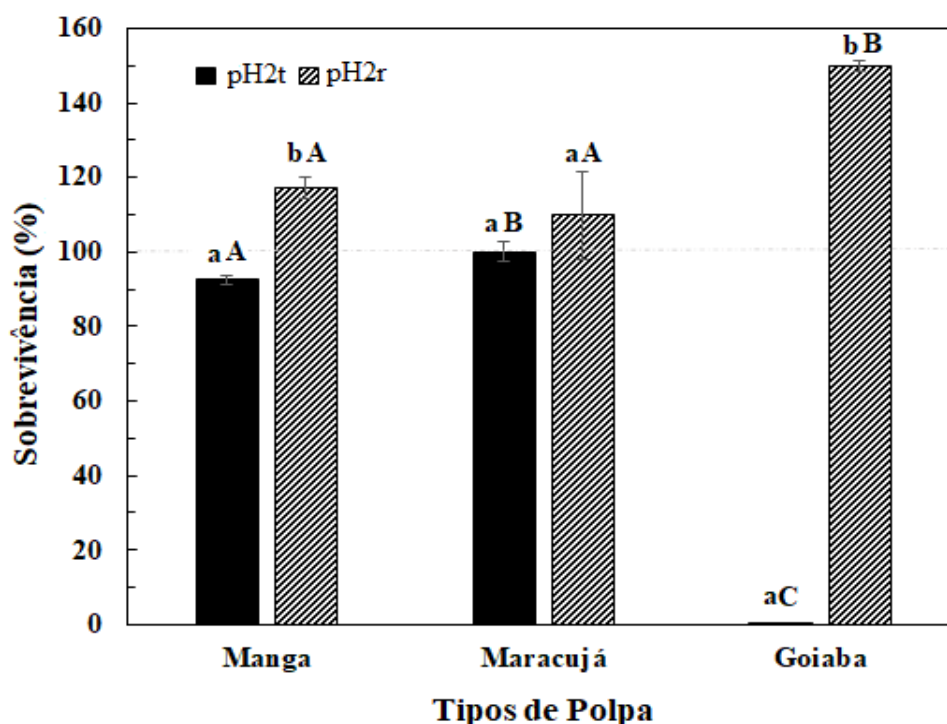
Em todas as condições analisadas para a polpa de maracujá, verificou-se que *Lactobacillus rhamnosus* ATCC 7469 conseguiu ao menos sobreviver, consumir os substratos disponíveis e ainda produzir ácido láctico, conseguindo executar todas as funções do seu metabolismo mesmo quando em situações de estresse. Diminuição na viabilidade assim como na atividade metabólica, são aspectos observados sob estresse ácido (CHEN et al., 2017), uma vez que a maquinaria celular necessita direcionar seu metabolismo para mecanismos de reparo, buscando assim a homeostase do pH intracelular e evitando danos e alterações no envelope celular, bem como no DNA microbiano (MONTORO et al., 2017)

Apesar do teor de glicose nos meios de maracujá serem semelhantes aos observados para os meios à base de goiaba, a maior concentração proteica dessa fruta provavelmente protegeu as células do estresse ácido (PIMENTEL et al., 2019), auxiliando assim na manutenção da viabilidade de *L. rhamnosus* em MJA2t e MJA2r.

5.3.3 Comparação da sobrevivência de *L. rhamnosus* nos meios de manga, maracujá e goiaba em pH ajustados para 2 durante seleção total e reduzida

A Figura 15 retrata em si a sobrevivência ou o crescimento das células de *L. rhamnosus* após as 12 horas de fermentação em pH 2, para os processos de seleção total (t) e reduzida (r), nos meios formulados a partir das polpas.

Figura 15. Sobrevivência em porcentagem de *L. rhamnosus* ATCC 7469 nos meios de manga, maracujá e goiaba em pH 2 para seleção total (pH2t) e seleção reduzida (pH2r) após as 12h de cultivo.



Fonte: A autora (2021).

Para a etapa de seleção total percebeu-se que a sobrevivência microbiana variou de acordo com o tipo de meio vegetal. No meio do suco de goiaba (GBA2t) o processo não foi bem sucedido, uma vez que o micro-organismo se mantendo viável apenas nas 2 primeiras horas de cultivo. Em meio à base de manga (MGA2t) as células apresentaram sobrevivência de 92,6 %, sendo esta a maior do que a sobrevivência encontrada em pH 4 (82,3 %). Por sua vez, no meio do suco de maracujá (MJA2t), foi observado além da total sobrevivência microbiana um discreto crescimento de aproximadamente 0,1 %.

Por sua vez, para a seleção reduzida, verificou-se que *L. rhamnosus* não só conseguiu sobreviver (100 %) como também apresentou crescimento para todos os meios de suco de fruta. Os crescimentos observados em GBA2r, MGA2r e MJA2r foram de 50 %, 17,4 % e 10 %, nesta respectiva ordem.

Estatisticamente foi possível verificar que, para os meios de manga e goiaba, a seleção reduzida garantiu aumento no percentual de células viáveis após as 12 horas de cultivo. No meio à base de maracujá também foi observada

a mesma tendência, no entanto, não foi verificada diferença entre o percentual de células viáveis existentes após as 12 horas de seleção total e reduzida.

Exceto na seleção total realizada em meio de goiaba, o micro-organismo foi capaz de sobreviver em todas as condições. Porém, quando as células estavam no processo de seleção reduzida, o micro-organismo ainda foi capaz de ter melhor desempenho, apresentando crescimento. Isso está relacionado à ausência da etapa intermediária do pH 4, pois ao ser transferido do pH 6 diretamente para o pH 2, *L. rhamnosus* saiu de uma situação ótima de crescimento, tendo maior robustez celular para enfrentar às condições adversas de um pH mais ácido, como o 2.

5.3.4 Sobrevivência de *L. rhamnosus* ATCC 7469 nas condições gastrointestinais simuladas

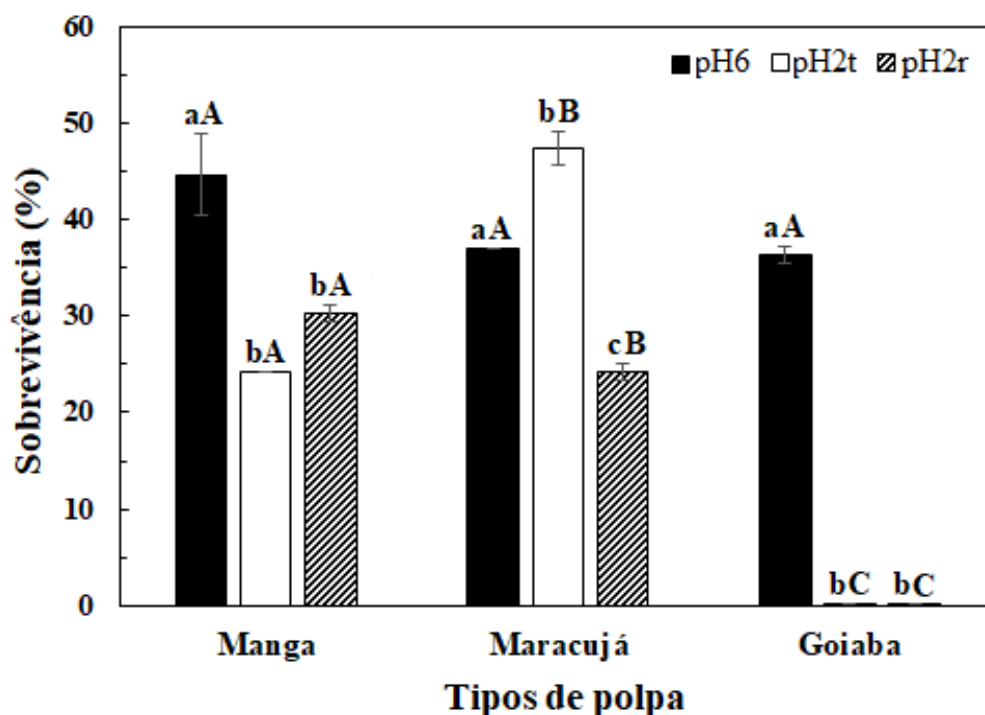
Após acompanhar o comportamento de *L. rhamnosus* ATCC 7469 nos três sucos para diferentes condições de pH, realizou-se o TSGI para as células que sobreviveram à seleção total e reduzida em pH 2. Este teste foi realizado com o propósito de verificar a influência do estresse ácido na sobrevivência microbiana em condições gastrointestinais simuladas.

A sobrevivência de *L. rhamnosus* ATCC 7469 após simulação das condições gastrointestinais em cada um dos meios vegetais está registrada na Figura 16. As células cultivadas em pH 6 foram utilizadas como grupo controle, uma vez que não foram submetidas a estresse ácido.

No meio do suco de goiaba, o processo de seleção, seja ela total ou reduzido, não promoveu melhoria na sobrevivência microbiana em condições simuladas do sistema digestório, e sim o contrário. Apenas as células do grupo controle mostraram-se aptas a sobreviver ao TSGI, apresentando sobrevivência de 36,32%.

Para o meio do suco de manga verificou-se, assim como no meio de goiaba, que ambas as seleções não foram capazes de potencializar a sobrevivência de *L. rhamnosus* no TSGI. Os processos de seleção total e reduzida promoveram redução de 20,4 % e 14,3 % no percentual de células sobreviventes após simulação gastrointestinal, respectivamente.

Figura 16. Sobrevivência de *L. rhamnosus* ATCC 7469 ao teste de simulação das condições gastrointestinais após serem submetidas a seleção total (pH2t) e reduzida (pH2r). O grupo controle foi cultivado em pH 6. Diferentes letras minúsculas indicam que os valores diferem significativamente ($\alpha \leq 0.05$) para a polpa; diferentes letras maiúsculas indicam que os valores diferem significativamente ($\alpha \leq 0.05$) entre as polpas.



Fonte: A autora (2021).

Nestes casos, as condições prévias de estresse nos meios de goiaba e manga não tiveram efeito positivo sobre a resistência de *L. rhamnosus* ao TSGI. A queda na porcentagem de sobrevivência pode ter sido motivada por alterações na funcionalidade da F-ATPase do probiótico, uma vez que isso pode acarretar na menor sobrevivência de bactérias lácticas em pH ácido (WANG et al., 2017). Outros fatores, como produção de substâncias alcalinas, alteração na membrana citoplasmática assim como seus teores de ácido graxo e proteção ou reparo de macromoléculas estão envolvidos na capacidade de adaptação e resistência ácida (HUANG et al., 2016). Com base nisso, se faz necessário investigar e estabelecer experimentalmente os mecanismos intracelulares envolvidos na resistência ácida de *L. rhamnosus*.

Por sua vez, no meio de suco de maracujá o mesmo padrão observado nos demais meios foi verificado para as células provenientes da seleção reduzida, uma vez que o percentual de células sobreviventes foi inferior (24 %)

ao observado para as células controle (37 %). No entanto, quando *L. rhamnosus* foi submetido a seleção total sua sobrevivência foi potencializada, atingindo 47,3 %. Após TSGI a viabilidade celular observada na condição controle foi de 3,47 Log UFC/mL, enquanto em MJA2t foi de 4,58 Log UFC/mL, refletindo aumento de mais de 1 Log UFC/mL. Sendo assim, foi possível observar que a seleção em gradiente total em meio de suco de maracujá potencializou a sobrevivência do micro-organismo.

De acordo com os resultados obtidos por Mathipa e Thantsha (2015), os autores evidenciam que a pré-exposição às condições estressantes resulta em um aumento na sobrevivência das células nas mesmas condições posteriormente. Em nosso trabalho, a partir dos testes realizados nos diferentes meios vegetais, constatamos que além da exposição prévia, no caso, a acidificação sucessiva do meio, o tipo do meio também exerce influência sobre o comportamento microbiano, podendo assim prejudicar ou potencializar a sobrevivência no TSGI.

O bom desempenho do probiótico após seleção em gradiente total quando disposto em suco de maracujá pode estar relacionado à composição da polpa, principalmente o teor proteico, uma vez que proteínas podem proteger as células do estresse ácido (PIMENTEL et al., 2019), potencializando assim a viabilidade do probiótico. Além das proteínas, os teores de carboidratos e minerais também podem alterar a eficácia e viabilidade probiótica (FLACH et al., 2017). Sendo assim, encorajamos estudos que busquem elucidar como a matriz alimentar, especialmente nos sucos de fruta, pode influenciar na resistência probiótica às condições gastrointestinais.

Por fim, os resultados obtidos e apresentados nessa seção com base no TSGI foram de suma importância, visto que a partir desta avaliação realizou-se a escolha de dois grupos, de acordo com o maior índice de sobrevivência para *L. rhamnosus*, MGA6 (44,6 %) e MJA2t (47,3 %). As células de *L. rhamnosus* obtidas em ambas as condições foram direcionadas aos experimentos subsequentes para elaboração das bebidas com ou sem inulina e/ou xilitol e avaliação da estabilidade dos produtos gerados em estoque refrigerado.

5.4 ELABORAÇÃO DE BEBIDAS FUNCIONAIS DE POLPA DE MANGA E MARACUJÁ

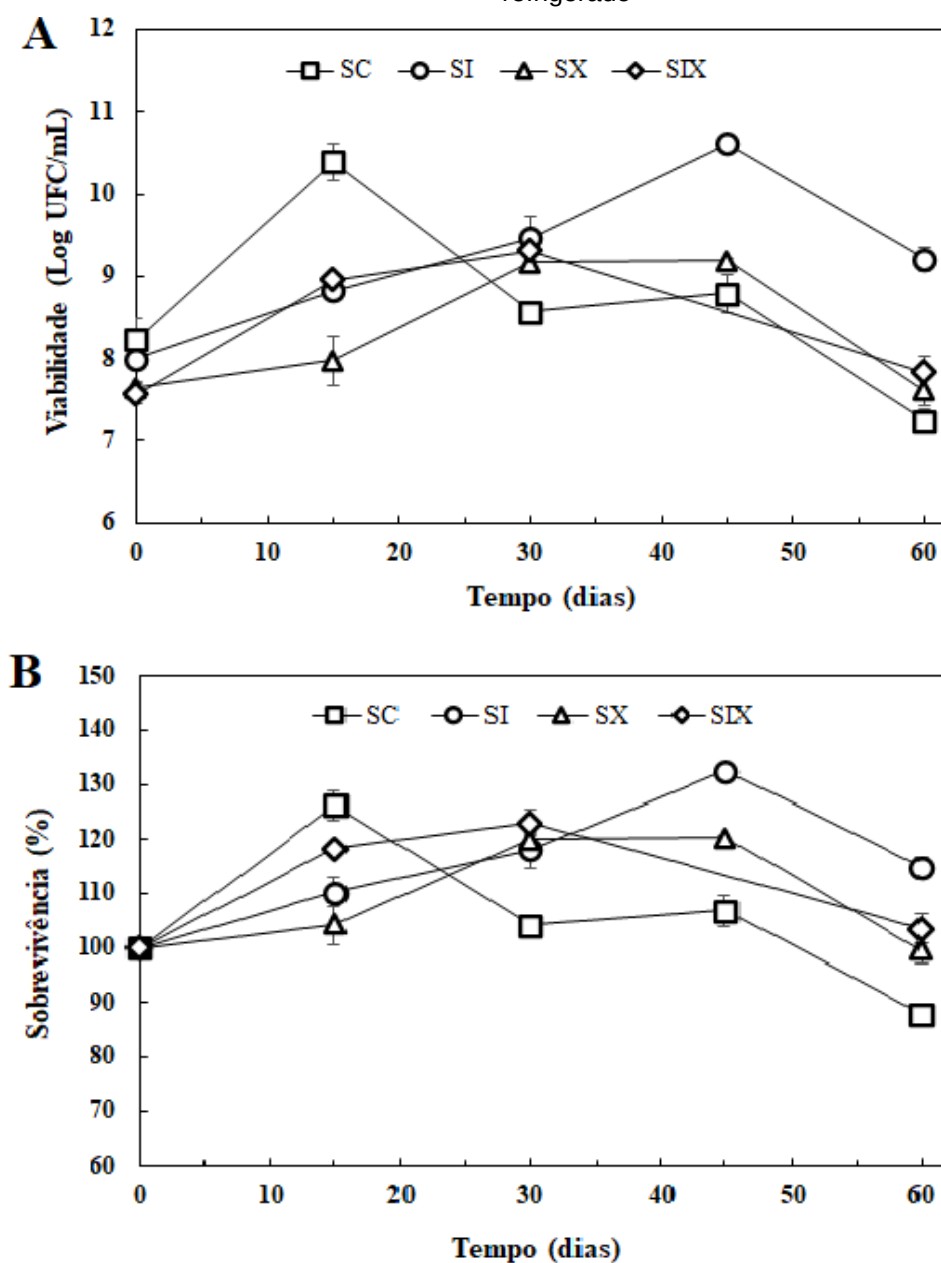
Na presente etapa, as células de *L. rhamnosus* oriundas do cultivo em pH 6 em manga (MGA6) e da seleção total em maracujá (MJA2t) foram utilizadas na geração de quatros produtos para cada polpa: Suco com inulina (SI), suco com xilitol (SX), suco com inulina e xilitol (SIX), e suco controle (SC), ou seja, sem aditivos. Vale colocar em destaque que a concentração de polpa utilizada para a elaboração das bebidas manteve-se em 55 % (v/v) assim como utilizado durante as fermentações em estresse ácido.

Cada produto gerado, teve seu °Brix determinado no início do período de estudo e foi avaliado levando em consideração a estabilidade dos seguintes parâmetros ao longo dos 60 dias do estoque refrigerado: viabilidade celular, sobrevivência celular as condições de estocagem, pH, concentração de glicose, frutose, sacarose e ácido láctico, bem como sobrevivência ao TSGL.

5.4.1 Bebidas de manga

Os valores para viabilidade e sobrevivência celular ao longo do estoque refrigerado para as bebidas à base de polpa de manga e células controle podem ser observados na Figura 17.

Figura 17. Viabilidade (A) e Sobrevivência (B) de *L. rhamnosus* nos sucos controle (SC), com inulina (SI), com xilitol (SX) e com inulina e xitol (SIX) à base de polpa de manga durante estoque refrigerado



Fonte: A autora (2021).

Ao longo do estudo, a viabilidade celular (Figura 17a) variou, independentemente da adição de inulina e/ou xitol. No grupo controle (SC) a viabilidade de *L. rhamnosus* apresentou aumento (26,24%) nos 15 primeiros dias de estoque. Após esse período houve diminuição de 30,25%, atingindo assim 7,25 Log UFC/mL. Embora tenha ocorrido queda na viabilidade, é importante

salientar que o micro-organismo se manteve acima dos níveis de concentração recomendados, ou seja, entre 6 a 7 Log UFC/g ou mL de bioproduto (COMAN et al., 2012). Desta forma, suco de manga se mostrou um meio promissor para a incorporação do probiótico em questão, visto que, mesmo sem a adição de aditivos, o número de células foi superior a 7 Log UFC/mL aos 60 dias de estoque.

Diferentemente do observado no presente estudo, Acevedo-Martínez et al. (2018) verificaram que *L. rhamnosus* HN001 começou a perder sua viabilidade após 15 dias de armazenamento refrigerado (4 °C) em suco de manga, atingindo assim cerca de 6,00 Log UFC/mL aos 20 dias. Por outro lado, neste mesmo trabalho, o mesmo suco apresentou-se mais adequado para a incorporação de *L. casei*, o qual manteve sua viabilidade em torno de 7 Log UFC/mL durante 30 dias de estoque refrigerado.

Esses resultados demonstram a necessidade de se avaliar o comportamento de diferentes probióticos em sucos durante estoque refrigerado, uma vez que podem haver variações comportamentais baseadas na espécie e/ou linhagens utilizadas. É importante salientar que, *L. rhamnosus* ATCC 7469 foi capaz de manter sua viabilidade por um período maior em relação a *L. rhamnosus* HN001 e *L. casei* observados por Acevedo-Martínez et al. (2018). Sendo assim, essa linhagem apresenta maior resistência em suco de manga fermentado durante o armazenamento prolongado.

A adição isolada de inulina promoveu aumento contínuo na viabilidade de *L. rhamnosus* ao longo dos 45 dias. Durante este período a densidade celular atingiu 10,60 Log UFC/mL, valor equivalente ao atingido nos 15 primeiros dias do suco controle (SC) Estudos têm demonstrado que alguns micro-organismos podem crescer em temperaturas mais baixas, apesar de não ser uma condição ideal para crescimento (VALÍK et al., 2008; MATEJČEKOVÁ et al., 2016).

Em ambos os casos, ou seja, no suco controle e com inulina, após aumento da densidade celular verificou-se morte. Pimentel et al. (2015), observaram que a viabilidade de *L. paracasei* em suco de maçã suplementado com oligofrutose reduziu de 8 Log UFC/mL para 6,7 Log UFC/mL após 28 dias de armazenamento refrigerado (4 °C). Segundo os autores, a redução na

viabilidade probiótica pode estar relacionada a acidez, a presença de oxigênio ou ao baixo teor de compostos nitrogenados.

Ainda referente ao SI, constatou-se que a adição de inulina influenciou positivamente a viabilidade microbiana no transcorrer dos primeiros 45 dias. Isto implica dizer que a incorporação desse frutano favoreceu a sobrevivência microbiana, como pode ser observado na Figura 17b.

Andrade et al. (2019), observaram que a adição de inulina em suco de goiaba fermentado aumentou em 19 % a sobrevivência de *L. rhamnosus* ATCC 7469 durante 28 dias de armazenamento refrigerado, corroborando os resultados observados no presente estudo. Por sua vez, no trabalho de Khezri et al. (2018), a adição de inulina em suco de figo gerou melhores resultados para a viabilidade de *L. delbrueckii* no transcorrer do armazenamento. O suco probiótico com inulina apresentou maior contagem celular após 28 dias de estoque, mantendo-se 1 Log acima do tratamento sem inulina durante todo o período. Sendo assim, a incorporação de inulina em sucos de fruta probióticos aumenta a sobrevivência e possibilita a manutenção celular ao longo do estoque refrigerado

Assim como no SC, houve aumento de 10 % e 18 % na viabilidade nos primeiros 15 dias nos SI e SIX, respectivamente. Por sua vez, a incorporação isolada do xilitol (SX) postergou esse aumento, que foi de 20 % aos 30 dias do estudo.

Sendo assim, o xilitol favoreceu a estabilidade durante os primeiros 15 dias (SX), diferentemente do observado para as demais condições, em que, neste mesmo período apresentaram aumento na densidade celular. Aos 30 dias ocorreu aumento de aproximadamente 16 % para a concentração de células viáveis em comparação ao observado nos 15 dias de estudo. Aos 60 dias (Figura 17a) verificou-se queda da viabilidade. Desta forma, a adição de xilitol promoveu retardo na variação da viabilidade do micro-organismo, nos indicando assim maior estabilidade tanto para este parâmetro quanto para a sobrevivência do probiótico as condições de estoque (Figura 17b).

No suco com inulina e xilitol (SIX) houve aumento na viabilidade nos 15 primeiros dias, sendo mais discreta da observada para o suco controle. Após esse período, a viabilidade permaneceu estável ($9,10 \pm 0,22$ Log UFC/mL) e aos 60 dias, apresentou queda de aproximadamente 16 %. Independentemente de ter sido observado aumento na viabilidade durante os 30 primeiros dias de estoque para o SIX, a flutuação da densidade celular foi semelhante à do suco com xilitol (SX), tendo, ambos, menores variações para a viabilidade das observadas no suco controle (SC) e com inulina (SI).

De acordo com Mohamad et al. (2015), o xilitol, além de ser antioxidante, apresenta propriedade crioprotetora e estabilizante. O que indica que a incorporação desse componente em sucos de fruta probióticos promove maior estabilidade celular, reduzindo a susceptibilidade à fermentação e minimizando o crescimento de agentes patogênicos ao longo do armazenamento. Associado a isso, Salli et al. (2019) verificaram que diferentes linhagens de *Lactobacillus*, dentre as quais estavam *L. rhamnosus* GG e *L. rhamnosus* LB21, não crescem na presença de xilitol, sugerindo que esse adoçante não potencializa a viabilidade de *L. rhamnosus*.

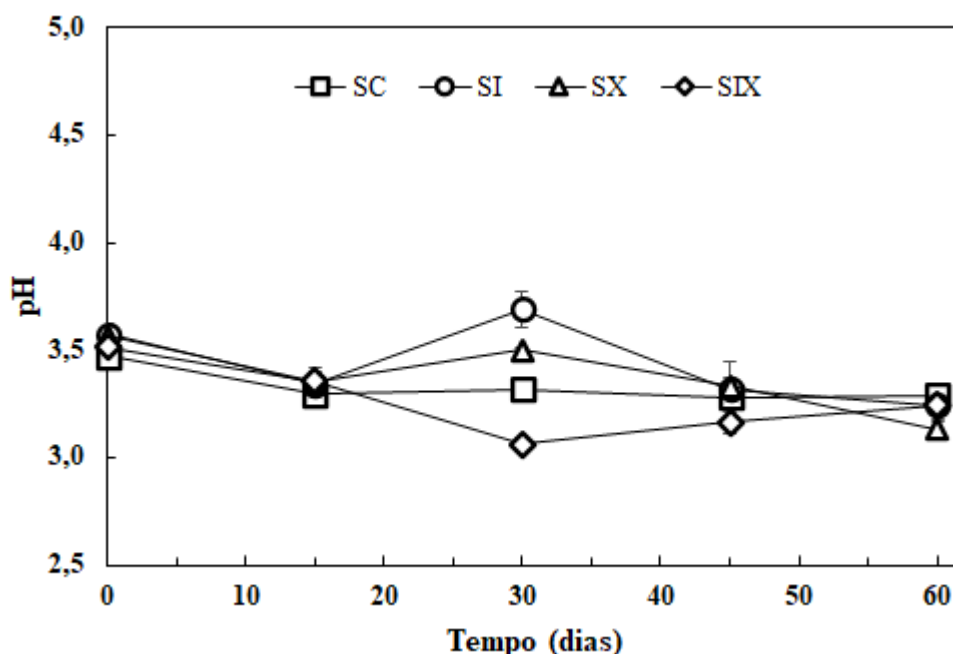
Com base na avaliação das quatro bebidas funcionais de manga, constatou-se que a adição de inulina isoladamente (SI) potencializou o aumento da viabilidade (Figura 17a) e da sobrevivência até os 45 dias de estoque (Figura 17b), de forma gradual e contínua quando comparado com o SC. A ausência de aditivos (SC) não impediu as oscilações da viabilidade em suco de manga, porém reduziu a manutenção celular a partir dos 30 dias de armazenamento. Por sua vez, a incorporação do xilitol, isoladamente (SX) ou associado a inulina (SIX), minimizou variações da viabilidade, promovendo assim maior estabilidade para esse parâmetro ao longo do estoque refrigerado.

Comparando as viabilidades inicial e final, foi possível observar que não houve redução da viabilidade nas formulações, exceto no SC, havendo um número maior de células viáveis ao final do estoque refrigerado (Figura 17a). Nas bebidas com aditivos pode-se perceber que a sobrevivência ao longo do estudo foi igual ou superior a 100 % (Figura 17b). Para o suco controle, a sobrevivência aos 60 dias foi de 88 %.

Esses dados demonstram que o suco de manga é um meio adequado para ser utilizado como veículo de *L. rhamnosus* ATCC 7469. O bom desempenho do probiótico na bebida de manga pode estar relacionado com a disponibilidade do ácido ascórbico inerente a polpa (Tabela 2). Segundo Acevedo-Martínez et al. (2018), esta vitamina é capaz de capturar o oxigênio dissolvido no sistema. Ao realizar esse sequestro, o ácido gera um ambiente anaeróbio, por reduzir o potencial redox, tornando assim o meio adequado para lactobacilos em geral. Além disso, a presença de açúcares, minerais e proteínas é de grande importância para a manutenção da viabilidade celular.

A Figura 18 traz em si os valores para o pH dos quatro grupos durante o estoque refrigerado. É interessante observar que, nos primeiros 15 dias, o pH das bebidas apresentou comportamento semelhante, tendo redução. Entre 15 e 45 dias, o comportamento do pH foi diferente nos quatro casos. No SC, o pH manteve-se constante. Nos sucos apenas com inulina (SI) ou com xilitol (SX) foi observado aumento de 10,5% e 4,5 %, respectivamente, seguido de redução. E no SIX houve redução de 8,8 % aos 30 dias, seguido de estabilização.

Figura 18. Valores dos pHs para os sucos controle (SC), com inulina (SI), com xilitol (SX) e com inulina e xilitol (SIX) à base de polpa de manga durante estoque refrigerado.



Fonte: A autora (2021).

Ao final do estoque refrigerado, o pH dos sucos controle (SC), suco inulina (SI) e suco inulina e xilitol (SIX) manteve-se estável. Por outro lado, foi observada redução de 12 % no pH do suco xilitol (SX). Apesar dessas variações, o pH ao longo do estudo não foi menor que 3 e nem maior que 3,7, para todos os grupos avaliados.

De forma geral, o aumento na viabilidade ao longo do estoque (Figura 17 a) exerceu influência sobre o pH dos quatro produtos à base de manga. Apesar do ambiente refrigerado não conter as condições ideais para o crescimento de *L. rhamnosus*, o aumento da viabilidade gerou a produção de ácido láctico (Tabela 3), principal produto do metabolismo primário das bactérias ácido-láticas. Ao compararmos o pH inicial e após 60 dias de estudo, podemos observar que todas as bebidas apresentaram queda desse parâmetro.

Tabela 3. Concentrações para glicose, frutose e ácido láctico nos sucos controle (SC), com inulina (SI), com xilitol (SX) e com inulina e xilitol (SIX) à base de polpa de manga em 0 e 60 dias de estoque refrigerado.

Período	Parâmetro	Formulação			
		SC	SI	SX	SIX
Inicial	Glicose (g/L)	11,17 ± 0,70 ^{aA}	10,68 ± 0,33 ^{aA}	9,71 ± 0,16 ^{aA}	9,94 ± 0,26 ^{aA}
	Frutose (g/L)	17,79 ± 0,17 ^{Aab}	18,27 ± 0,47 ^{aB}	16,10 ± 0,68 ^{aA}	16,08 ± 0,07 ^{aA}
	Ac. Láctico (g/L)	6,29 ± 0,79 ^{Aa}	6,49 ± 0,01 ^{aA}	5,61 ± 0,09 ^{aA}	5,30 ± 0,11 ^{aA}
Final	Glicose (g/L)	10,16 ± 0,01 ^{aA}	11,95 ± 0,01 ^{bB}	10,27 ± 0,03 ^{bA}	9,52 ± 0,12 ^{aC}
	Frutose (g/L)	17,74 ± 1,55 ^{aAB}	19,78 ± 0,16 ^{aB}	16,39 ± 0,12 ^{aA}	16,76 ± 0,05 ^{bA}
	Ac. Láctico (g/L)	11,76 ± 0,42 ^{bA}	10,21 ± 0,15 ^{bA}	9,94 ± 0,93 ^{bA}	10,76 ± 0,45 ^{bA}

^{ABC} letras iguais na horizontal não diferem significativamente ($\alpha \leq 0,05$) entre si.

^{abc} letras iguais na vertical não diferem significativamente ($\alpha \leq 0,05$) entre si.

Fonte: A autora (2021).

Segundo Shori (2013), a queda no pH ao longo da refrigeração pode ocorrer, especialmente, pela atividade metabólica residual das bactérias. No caso de *L. rhamnosus*, essa atividade deve ter sido aumentada em decorrência das características nutricionais da polpa de manga (Tabela 2), por ser rica em nutrientes, como vitaminas, minerais, proteínas e carboidratos. Além disso, a

ausência de culturas iniciais que pudessem competir por nutrientes (KUMAR et al., 2015), corroboram com o potencial de probiotização do suco de manga pela linhagem de *L. rhamnosus* ATCC 7469.

A quantidade inicial de glicose foi igual em todas as formulações. Para a frutose, foi observado que o suco com inulina (SI) apresentou maior concentração inicial quando comparado com os demais sucos contendo aditivos (SX e SIX). De acordo com as análises realizadas em CLAE não foi possível quantificar o consumo de glicose e frutose ao longo do estudo, uma vez que não houve queda em suas concentrações ao longo dos 60 dias de estudo (Tabela 3).

O aumento nos valores da glicose, após 60 dias de estudo, nos sucos com inulina (SI) e com xilitol (SX) e da frutose no SIX, ressaltam a presença de sacarose nas bebidas, inerente da própria polpa, e sua inversão durante o período de armazenamento. A inversão da sacarose é uma reação química que transforma esse dissacarídeo em glicose e frutose (CHANTASIRIWAN, 2020). Brighenti et al. (2011) ao avaliarem a capacidade de inversão da sacarose em sucos de limão, observaram que fatores como pH, concentração e teor de ácido cítrico podem influenciar no rendimento da inversão.

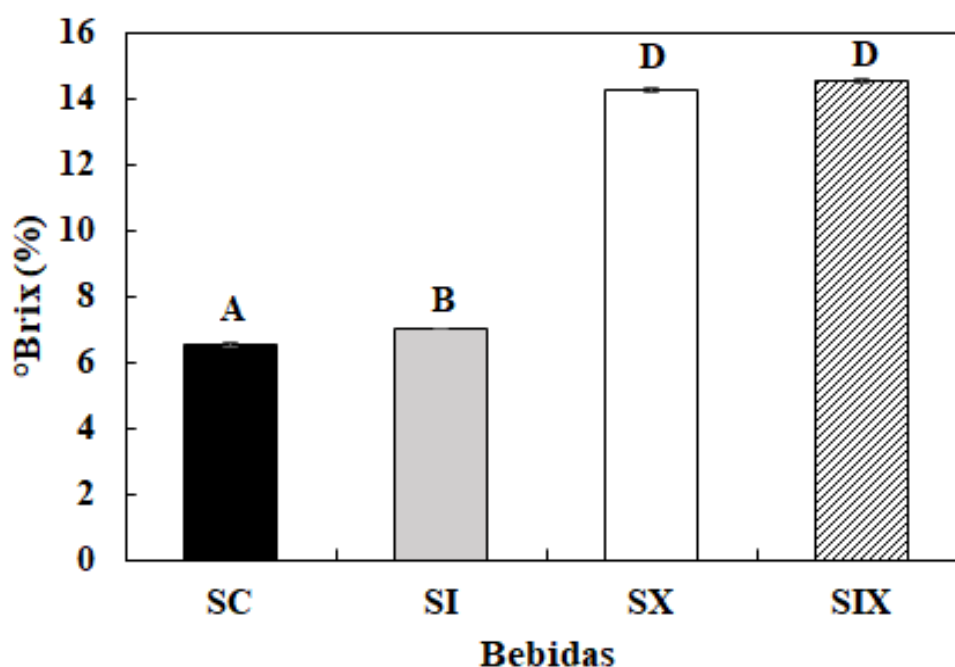
Associado a análise em CLAE, realizou-se a quantificação dos açúcares redutores totais (ART). Os teores iniciais nos SC, SI, SX e SIX, foram de 47,79 g.L⁻¹, 35,84 g.L⁻¹, 80,05 g.L⁻¹ e 71,70 g.L⁻¹, respectivamente. Desta forma, a adição do xilitol resultou em aumento no teor de açúcares disponíveis. Os valores de açúcares redutores totais no SC e SI apresentaram-se estáveis ao longo do armazenamento. Por outro lado, a redução no ART de 28,4 % e 16,7 % nos SX e SIX, nessa ordem, indicando assimilação de açúcares.

Apesar do aumento no valor energético para os produtos contendo xilitol, é válido salientar que a adição desse adoçante ainda se faz vantajosa quando comparado com a sacarose. De acordo com o Dossiê Edulcorantes (2013), o xilitol apresenta apenas 2,4 kcal/g, enquanto a sacarose possui 4,0 kcal/g, o que significa que a utilização do xilitol pode resultar numa diminuição de 40% do valor calórico do suco. Além disso, por ser um adoçante natural, é encontrado em processos do metabolismo humano, não havendo evidências de danos à saúde,

o que não pode ser considerado para outros tipos de adoçantes como sacarina, ciclamato e aspartame (PEREIRA, 2005).

Adicionalmente, o °Brix foi quantificado no início do estoque para as quatro formulações, como pode ser observado na Figura 19. A escala em percentagem de °Brix representa as concentrações percentuais dos sólidos solúveis contidos em uma amostra (CAVALCANTI et al., 2006), refletindo também o percentual de açúcares dissolvidos no meio. Em manga, a adição de xilitol, bem como da inulina, promoveu aumento neste parâmetro, uma vez que a incorporação desses aditivos aumentou o teor de sólidos solúveis.

Figura 19. Valores obtidos no início do estoque refrigerado do °Brix para o suco controle (SC), suco com inulina (SI), suco com xilitol (SX) e suco com inulina e xilitol (SIX) à base de polpa de manga. Diferentes letras maiúsculas indicam que os valores diferem significativamente ($\alpha \leq 0.05$) entre as bebidas.



Fonte: A autora (2021).

Os teores de °Brix no suco controle e com adição de inulina ficaram abaixo do valor mínimo de 11, estabelecido para bebidas à base de manga (*Mangifera indica* L.) pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA, 2018). A adição do xilitol possibilitou que os produtos se enquadrassem no exigido pela legislação brasileira. Apesar de ter havido aumento do índice calórico do produto, a adição de xilitol ainda é vantajosa quando comparada à

da sacarose, pois garante 40 % menos kcal/g (Dossiê Edulcorantes, 2013). Além de ser um adoçante hipocalórico, o xilitol pode auxiliar na regulação da glicose e modificação da microbiota intestinal (SODERLING et al., 2008; UEBANSO et al., 2017) potencializando a ação funcional dos produtos que o contém.

Por fim, para a concentração de ácido láctico, não houve diferença significativa entre os quatro grupos no início do estoque (Tabela 3). Apesar de ter sido observada produção nas quatro formulações, quantitativamente não apresentaram diferença entre si após os 60 dias. Desta forma, podemos afirmar que a incorporação de inulina e xilitol não exerceu influência sobre a produção do ácido láctico. Contudo, apesar da viabilidade ao longo do estoque, a produtividade de ácido láctico foi baixa, com valor médio de $4.10^{-3} \pm 0,00$ g/L.h⁻¹ ao dia.

A presença desse ácido nos sucos fermentados pode ser vista como uma estratégia de conservação, uma vez que sua ação inibe a ação de organismos patogênicos, possibilitando a preservação dos componentes presentes no produto até seu consumo, potencializando assim a qualidade e reduzindo as chances de contaminação (AXELSSON & AHRNÉ, 2000). Além disso, a ação de bactérias ácido lácticas, como *L. rhamnosus*, exibe atividade antimicrobiana, por meio da produção de diferentes metabólitos, como bacteriocinas e peróxido de hidrogênio, que podem atuar como bioconservantes naturais (MOKOENA, 2017).

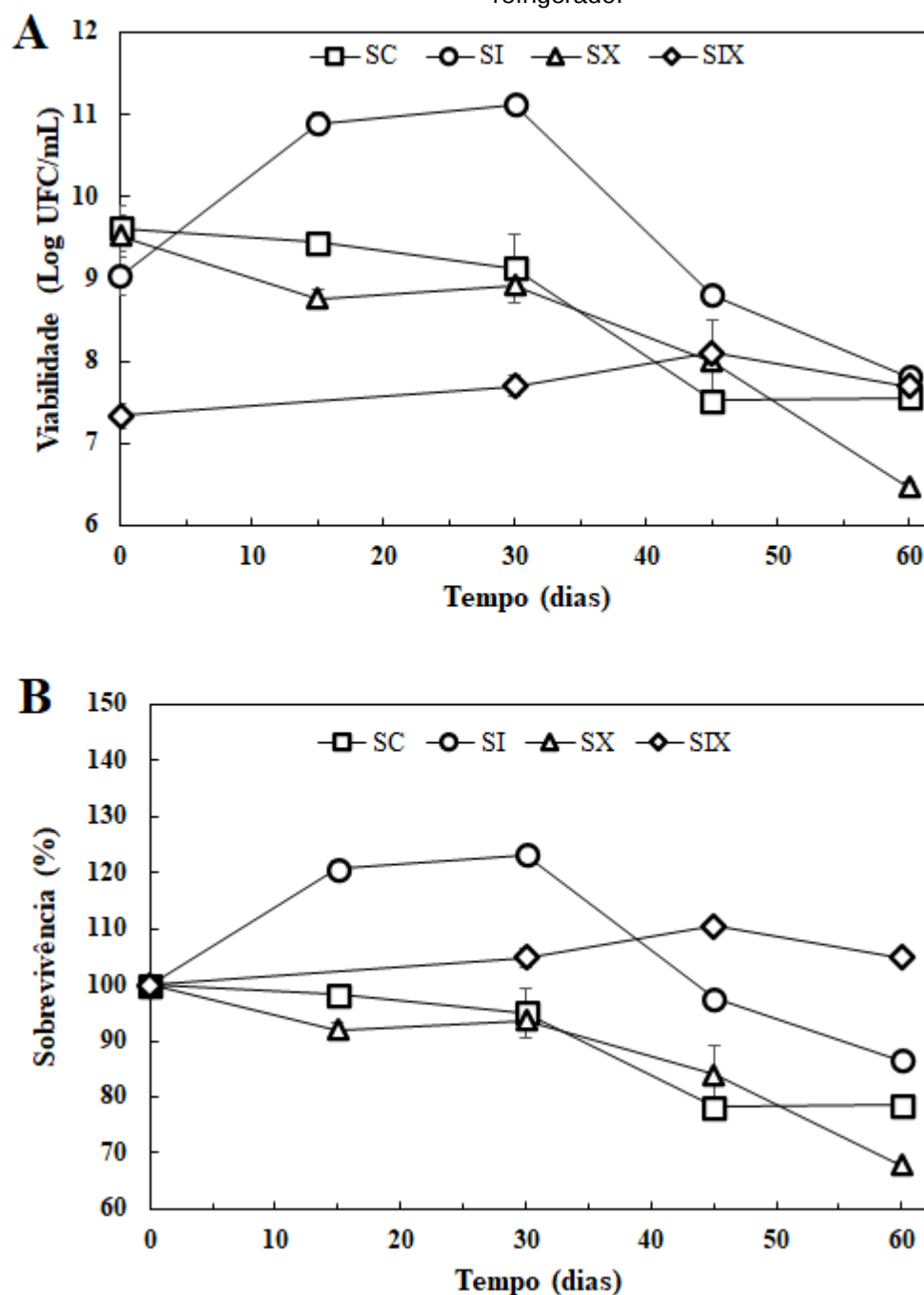
5.4.2 Bebidas de maracujá

Assim como realizado para as bebidas de manga, os valores da viabilidade e sobrevivência celular foram acompanhados ao longo de 60 dias de estoque refrigerado nos sucos de maracujá. Vale ressaltar que, neste caso, as células utilizadas para elaboração das bebidas foram selecionadas em gradiente total e no meio da mesma fruta (MJA2t). Diferentemente do observado para o suco controle (SC) de manga, em que ocorreu aumento da viabilidade nos 15 primeiros dias, em maracujá, houve estabilidade para este parâmetro (Figura 20

a), assim como para a sobrevivência (Figura 20 b). Após 30 dias, a viabilidade reduziu 17,60 %, e se estabilizou, atingindo 7,55 Log UFC/ mL após 60 dias.

Sendo assim, as células utilizadas na elaboração do SC à base de maracujá apresentaram menores flutuações da viabilidade ao longo do armazenamento quando comparadas com as células empregadas no SC de manga. Esse padrão comportamental pode ter ocorrido em decorrência da etapa fermentativa em estresse ácido. Assim como, pode ter sido influenciada pela característica de cada polpa (Tabela 2). Uma vez que, a composição nutricional das frutas, que envolve os teores de açúcares, minerais, vitaminas, proteínas, fibras dietéticas e antioxidantes têm efeitos importantes na viabilidade probiótica (SHORI, 2016).

Figura 20. Viabilidade (A) e Sobrevivência (B) de *L. rhamnosus* nos sucos controle (SC), com inulina (SI), com xilitol (SX) e com inulina e xilitol (SIX) à base de polpa de maracujá durante estoque refrigerado.



Fonte: A autora (2021).

Lactobacillus rhamnosus ATCC 7469 vem sendo utilizado na elaboração de sucos fermentados e não fermentados, mostrando viabilidades superiores a 7 Log UFC/mL em estoque refrigerado (ANDRADE et al., 2019). Farias et al. (2016) verificaram que este probiótico manteve sua viabilidade estável ao longo

de 28 dias em suco de maracujá da caatinga (*Passiflora cincinnata* Mast.). Resultados semelhantes foram observados no presente estudo, durante 30 dias de estoque para o SC. No entanto, vale salientar, que o período de armazenamento empregado no presente trabalho foi superior ao realizado por Farias et al. (2016), refletindo assim que esta bebida pode ser mantida sob refrigeração por um período superior.

Por sua vez, o comportamento de *L. rhamnosus* no suco com xilitol (SX) foi semelhante ao observado para o suco controle (SC). No entanto, se distinguiu do observado em meio de manga, no qual houve aumento da viabilidade probiótica. A sobrevivência no SX (Figura 20 b) em maracujá, manifestou quedas sucessivas no decorrer do armazenamento, atingindo seu menor valor após 60 dias (68 %). Desta forma, tais resultados ressaltam que o tipo de polpa influencia no comportamento do probiótico ao longo do estoque. Além disso, os resultados apontam que *L. rhamnosus* ATCC 7469 não cresce na presença de xilitol, assim como verificado para *L. rhamnosus* GG e *L. rhamnosus* LB21 por Salli et al. (2019).

A adição de inulina isoladamente (SI) favoreceu o aumento da viabilidade celular em 10 % nos primeiros 15 dias de estoque, seguido de estabilidade e posterior queda até os 60 dias, momento em que o micro-organismo atingiu 9 Log UFC/mL. O aumento da viabilidade, tanto em manga quanto em maracujá, nos sucos contendo exclusivamente inulina (SI), reflete que esse prebiótico potencializa a atividade de *L. rhamnosus* ATCC 7469, indicando que a junção de ambos gera uma associação simbiótica.

Apesar da viabilidade inicial de *L. rhamnosus* ter sido inferior no SIX quando comparado com as demais bebidas, esta formulação apresentou maior estabilidade ao longo do armazenamento. Após 60 dias, foi a condição que garantiu maior sobrevivência probiótica (Figura 20 b), seguido do SI. Evidenciando que a incorporação de inulina trouxe benefícios à viabilidade microbiana ao longo do estoque.

Este prebiótico vem sendo relatado por proteger as células contra acidez e condições ambientais adversas (KHEZRI et al., 2018). Além disso, a inulina exerce um importante papel na manutenção celular durante o armazenamento

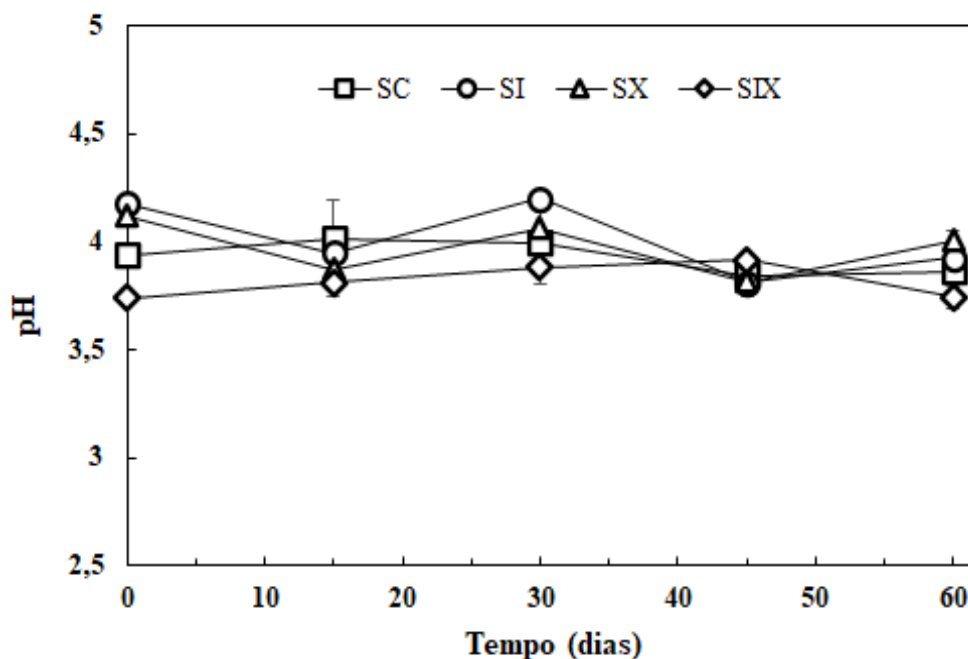
refrigerado, o que deve estar relacionado a sua atuação como fonte de carbono disponível para a manutenção das células, evitando assim lesões causadas pela acidez (KHEZRI et al., 2018).

Em oposição ao observado para as formulações à base de manga, a sobrevivência (Figura 20 b) de *L. rhamnosus* nos sucos controle (SC) e com xilitol (SX) apresentaram queda desde os 15 dias de estocagem. Estas formulações também apresentaram a menor estabilidade ao longo do período de estudo, com as menores sobrevivências após 60 dias. Apesar da sobrevivência microbiana ter aumentado até os 30 dias no suco com inulina (SI), ao final do estudo foi inferior a 100 %. Dentre as condições avaliadas, apenas no suco com inulina e xilitol (SIX) o micro-organismo manteve sua taxa de sobrevivência acima de 100 % durante todo o estudo, apresentando também maior estabilidade. Independente da viabilidade inicial, todas as bebidas, exceto o SX, apresentaram concentrações em torno de $7,7 \pm 0,10$ Log UFC/ml aos 60 dias de estoque refrigerado.

Associado aos valores observados para a viabilidade, os valores de pH das quatro formulações à base de maracujá foram acompanhados e podem ser observados na Figura 21. Tanto o SC quanto o SIX não tiveram variação no pH ao longo dos 60 dias. A ausência de crescimento em ambas as condições garantiu a estabilidade deste parâmetro nos produtos. A adição simultânea da inulina e do xilitol garantiram manutenção celular e consecutiva invariabilidade do pH, diferentemente do percebido no SC, onde ocorreu redução na sobrevivência devido a morte celular.

No suco com inulina (SI) houve variação do pH, provavelmente motivado pelo aumento da viabilidade durante o estoque (Figura 20 a). É interessante observar que mesmo sobre refrigeração e após ter passado por seleção em gradiente ácido, *L. rhamnosus* foi capaz de aumentar sua viabilidade na presença desse prebiótico, corroborando assim com a existência de efeito sinérgico entre eles.

Figura 21. Valores dos pHs para os sucos controle (SC), com inulina (SI), com xilitol (SX) e com inulina e xilitol (SIX) à base de polpa de maracujá durante estoque refrigerado.



Fonte: A autora (2021).

Para o suco com xilitol (SX) ocorreu discreta queda do pH nos primeiros 15 dias (6%), o que não foi relacionado a aumento da viabilidade (Figura 20 a). No entanto, esta foi a única condição em que houve diferença significativa para a concentração de ácido láctico no início e após 60 dias (Tabela 4), fator este que justifica o decaimento do pH.

Quando nos referimos à concentração de ácido láctico, verificamos que não houve diferença em sua concentração no suco controle (SC), suco inulina (SI) e suco inulina e xilitol (SIX) entre 0 e 60 dias. Por sua vez, *L. rhamnosus* foi capaz de produzir aproximadamente 3 g/L ao longo dos 60 dias quando em SX. É interessante observar que apesar de parecer um valor elevado, a produtividade foi de $2 \cdot 10^{-3} \pm 0,00$ g/L.h⁻¹ após 60 dias. Dessa forma, podemos constatar que a produção diária foi inferior da observada durante as fermentações realizadas em condições ideais de cultivo (Item 5.2), bem como a obtida nos sucos de manga.

O valor de pH das bebidas formuladas a partir de maracujá mantiveram-se em torno de $3,92 \pm 0,13$ durante os 60 dias de estoque refrigerado. As menores variações para a viabilidade nos sucos de maracujá, quando

comparadas com as formulações a base de manga, podem estar relacionadas a fatores como disponibilidade de açúcares, proteínas e minerais.

Tabela 4. Concentrações para glicose, frutose e ácido láctico nos sucos controle (SC), com inulina (SI), com xilitol (SX) e com inulina e xilitol (SIX) à base de polpa de maracujá em 0 e 60 dias de estoque refrigerado.

Período	Parâmetro	Formulação			
		SC	SI	SX	SIX
Inicial (0 dias)	Glicose (g/L)	0,78 ± 0,08 ^{aA}	0,91 ± 0,02 ^{aA}	0,66 ± 0,07 ^{aA}	0,69 ± 0,21 ^{aA}
	Frutose (g/L)	0,69 ± 0,09 ^{aAB}	1,06 ± 0,11 ^{aC}	0,63 ± 0,06 ^{aA}	0,93 ± 0,01 ^{aBC}
	Ac. Láctico (g/L)	15,71 ± 0,74 ^{aA}	16,09 ^{aA}	14,90 ± 0,46 ^{aA}	14,77 ± 0,59 ^{aA}
Final (60 dias)	Glicose (g/L)	0,35 ± 0,04 ^{bA}	0,57 ± 0,18 ^{aAB}	0,44 ± 0,05 ^{aAB}	0,83 ± 0,15 ^{aB}
	Frutose (g/L)	0,33 ± 0,04 ^{aA}	0,59 ± 0,25 ^{aAB}	0,70 ± 0,08 ^{aAB}	0,97 ^{aB}
	Ac. Láctico (g/L)	16,93 ^{aAB}	18,28 ± 0,78 ^{aA}	17,82 ± 0,16 ^{bA}	14,70 ± 0,49 ^{aB}

^{ABC} letras iguais na horizontal não diferem significativamente ($\alpha \leq 0,05$) entre si.

^{abc} letras

iguais na vertical não diferem significativamente ($\alpha \leq 0,05$) entre si.

Fonte: A autora (2021).

Além disso, a ausência ou a baixa produtividade do ácido láctico ao longo do estoque refrigerado deve ter ocorrido pela elevada concentração deste composto desde o início do armazenamento, influenciando a atividade metabólica de *L. rhamnosus*. Assim como discutido anteriormente para as bebidas à base de manga, a presença de ácido láctico é uma estratégia promissora para a preservação de bebidas, evitando assim a contaminação por agentes patogênicos e aumentando a vida de prateleira dos produtos (AXELSSON & AHRNÉ, 2000; MOKOENA, 2017).

A quantidade de glicose disponível no início do estoque foi igual para as quatro formulações de maracujá (Tabela 4). Apesar de não ter sido observado aumento na viabilidade de *L. rhamnosus* quando em SC (Figura 20 a), está foi a única condição em que ocorreu consumo de glicose, com assimilação de 55 %. Nos sucos contendo inulina (SI) e xilitol (SX) foi observada tendência de consumo da glicose disponível. Por sua vez, não foi constatado assimilação deste carboidrato no SIX.

Para a frutose, houve tendência de consumo nos SC e SI. Por sua vez, nos sucos com xilitol (SX) e com inulina e xilitol (SIX) foi observado aumento nos teores após os 60 dias de estoque. O mesmo foi verificado para a glicose no SIX. Esses dados indicam que a sacarose presente na polpa pode estar sendo invertida, liberando seus monossacarídeos constituintes.

Ao compararmos a concentração de glicose e frutose disponíveis no início do estoque, foi possível constatar que as bebidas à base de manga dispunham de uma concentração 10 e 21 vezes superior para glicose e frutose quando comparados com os sucos de maracujá (Tabela 3 e 4). A maior disponibilidade desses monossacarídeos refletiu em menor estabilidade microbiana ao longo do armazenamento, visto que ocorreu aumento na densidade celular em todas as formulações ao longo dos 60 dias de estudo.

Segundo Nualkaekul et al. (2011), quando as células probióticas estão inseridas em ambientes com baixo pH ocorre aumento da energia necessária para manutenção do pH intracelular. Fator este que resulta na falta de ATP para a manutenção de outras funções críticas, causando assim morte microbiana. A necessidade de mais energia celular em ambientes ácidos justifica a maior estabilidade celular ao longo do estoque para os sucos à base de maracujá, visto que esta matriz possuiu menores teores de glicose e frutose disponíveis ao longo do armazenamento.

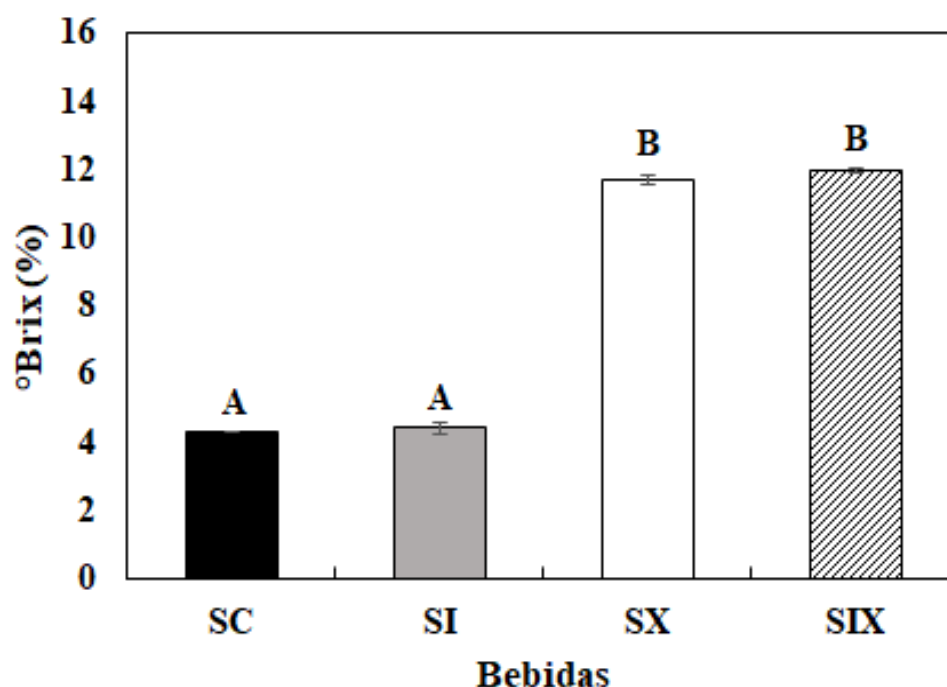
Com relação ao ART, os teores obtidos foram de 6,63 g.L⁻¹, 7,05 g.L⁻¹, 6,39 g.L⁻¹ e 11,59 g.L⁻¹ para SC, SI, SX e SIX, nesta ordem. Diferentemente do observado para o SX em manga, a adição isolada do xilitol (SX) não gerou aumento em relação ao grupo controle. Por sua vez, a adição de inulina isoladamente (SI) promoveu discreto aumento em relação ao SC. Foi observada redução para os açúcares redutores totais após 60 dias de estoque no SI (12 %), SX (24,3 %) e SIX (30,4 %), indicando assim consumo. Por sua vez, o ART no SC manteve-se estável, assim como verificado no suco controle de manga.

Apesar de não ter sido verificada variação na concentração de glicose ao longo do estudo para SI e SIX, a redução do ART nestas condições indica mais uma vez que uma outra fonte de carbono se encontra disponível na matriz alimentar. Acreditamos, assim como observado nos sucos de manga, que a

sacarose está exercendo influência no metabolismo de *L. rhamnosus*. Santos et al. (2017) verificaram que o consumo de sacarose por *L. rhamnosus* ATCC 7469 ao longo do estoque refrigerado em suco de maracujá da caatinga fermentado permitiu que o micro-organismo sobrevivesse aos 28 dias de armazenamento refrigerado, sem haver produção de ácido lático.

Os valores para o °Brix podem ser observados na Figura 22. Assim como verificado nas formulações à base de manga, a incorporação do xilitol trouxe aumento no teor de sólidos solúveis dissolvidos. Além disso, enquadrando as bebidas nas recomendações do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento para sucos de maracujá (*Passiflora* spp.) os quais devem apresentar °Brix mínimo de 11 (MAPA, 2018).

Figura 22. Valores obtidos no início do estoque refrigerado do °Brix para o suco controle (SC), suco com inulina (SI), suco com xilitol (SX) e suco com inulina e xilitol (SIX) à base de polpa de maracujá. Diferentes letras maiúsculas indicam que os valores diferem significativamente ($\alpha \leq 0.05$) entre as bebidas.



Fonte: A autora (2021).

O xilitol vem sendo empregado no desenvolvimento de diversos produtos disponíveis no mercado e sua aplicação tem aumentado ao longo dos anos. Sua

capacidade de manter baixos níveis glicêmicos e insulinêmicos, além de prevenir a sensação de fome, tornam o xilitol um adoçante capaz de auxiliar na manutenção dos níveis de glicose estáveis para diabéticas e não diabéticas (JANKET et al., 2019). Além disso, suas propriedades técnicas e biológicas favorecem sua utilização na indústria alimentícia, pois, além de não sofrer a reação de Maillard, limita a tendência a obesidade e ao aparecimento de cáries (GARCÍA-DIÉGUEZ et al., 2011).

5.4.3 Sobrevivência de *L. rhamnosus* nos sucos fermentados nas simulações gastrointestinais

A Tabela 5 traz em si a sobrevivência de *L. rhamnosus* ATCC 7469 nas bebidas fermentadas à base de manga, bem como a viabilidade inicial e final no teste de simulação gastrointestinal. As células provenientes da seleção em gradiente ácido e em polpa de maracujá (MJA2t), não foram capazes de sobreviver ao TSGI e por isso seus dados não são representados na tabela. O mesmo foi considerado, a partir dos 30 dias de armazenamento, para as bebidas à base de manga, uma vez que o micro-organismo não apresentou sobrevivência.

Tabela 5. Viabilidade inicial (*V_i*) e final (*V_f*), assim como a sobrevivência (*S* %), de *L. rhamnosus* ATCC 7469 na simulação das condições gastrointestinais durante estoque refrigerado nos sucos controle (SC), com inulina (SI), com xilitol (SX) e com inulina e xilitol (SIX) à base de polpa de manga.

Período	Formulação	<i>V_i</i> (Log UFC/mL)	<i>V_f</i> (Log UFC/mL)	<i>S</i> (%)
0 dias	SC	10,25 ± 0,6 ^a	2,12 ± 0,11 ^b	20,70 ± 1,12 ^{aA}
	SI	8,51 ± 0,11 ^a	2,60 ± 0,00 ^b	30,60 ± 0,08 ^{aB}
	SX	8,49 ± 0,02 ^a	0,00 ± 0,00 ^b	0,00 ± 0,00 ^{aC}
	SIX	8,60 ± 0,11 ^a	2,90 ± 0,14 ^b	33,82 ± 1,7 ^{aD}
15 dias	SC	7,54 ± 0,03 ^a	0,00 ± 0,00 ^b	0,00 ± 0,00 ^{bA}
	SI	8,25 ± 0,38 ^a	0,00 ± 0,00 ^b	0,00 ± 0,00 ^{bA}
	SX	8,78 ± 0,25 ^a	1,90 ± 0,54 ^b	21,00 ± 1,00 ^{bB}
	SIX	8,85 ± 0,00 ^a	4,64 ± 0,03 ^b	52,50 ± 0,34 ^{bC}

^{ABC} letras iguais na vertical não diferem significativamente ($\alpha \leq 0,05$) entre si.

^{abc} letras iguais na vertical ou na horizontal não diferem significativamente ($\alpha \leq 0,05$) entre si.

Fonte: A autora (2021).

No primeiro dia de estoque para as bebidas à base de manga foi observado que a incorporação de inulina (SI e SIX) ao produto garantiram maiores sobrevivência ao teste. Dentre os grupos avaliados, a formulação em que foi adicionado exclusivamente xilitol (SX) foi a única em que não foi observada sobrevivência microbiana.

Após 15 dias de armazenamento, foi observada sobrevivência probiótica apenas nas bebidas contendo xilitol (SX e SIX). Apesar de *L. rhamnosus* não ter sobrevivido no primeiro dia de estoque em SX, a presença de xilitol garantiu aumento desse parâmetro após 15 dias de armazenamento refrigerado, assim como observado no SIX.

Além de suas propriedades funcionais, o aspecto crioprotetor e estabilizante do xilitol devem ter favorecido (MOHAMAD et al., 2015) o aumento na sobrevivência celular ao TSGL. Sendo assim, mesmo sendo referenciado como fonte não metabolizada por *L. rhamnosus* (SALLI et al., 2019), este adoçante se mostrou capaz de potencializar a resistência ao estresse ácido durante simulação gastrointestinal após 15 dias de estoque em células não submetidas a estresse ácido prévio.

Por sua vez, a formulação contendo simultaneamente inulina e xilitol (SIX) demonstrou ser a mais promissora com relação ao teste de simulação gastrointestinal. De acordo com os dados obtidos, a sobrevivência probiótica ao TSGL aumentou 17,50 % após 15 dias de estoque refrigerado na presença conjunta desses componentes (SIX). Demonstrando assim, que a associação entre esses componentes potencializou a resistência celular de *L. rhamnosus* às condições gastrointestinais simuladas.

Tanto a inulina quanto o xilitol, vêm sendo referenciados como moduladores da microbiota intestinal (ROLIN, 2015; UEBANSO et al., 2017) por favorecer a propagação de células benéficas à saúde. Desta forma, a elaboração de uma nova formulação a partir de suco de manga, contendo esses componentes em associação com *L. rhamnosus* pode ser uma alternativa para o público que busca alimentos funcionais sem restrição. A garantia de sobrevivência probiótica ao TSGL, mesmo após 15 dias de armazenamento, sugere que esta formulação apresenta potencial de comercialização.

Desde os 30 dias, não foi observada sobrevivência celular ao TSGL em nenhuma das formulações à base de manga. Andrade et al. (2019) verificaram que esta mesma linhagem sobreviveu cerca de 30 % a esse mesmo teste aos 28 dias de armazenamento refrigerado em bebida fermentada à base de goiaba, acrescida de inulina e adoçada com stevia. Mostrando assim, que diferentes formulações podem gerar diferentes respostas do probiótico quando submetido a condições adversas. A presença e concentração de açúcares capazes de ser metabolizados (CORCORAN et al., 2005; ACEVEDO-MARTÍNEZ et al., 2018, assim como o tempo de armazenamento resfriado (CHAMPAGNE & GARDNER, 2008) também são aspectos que influenciam na sobrevivência de probióticos as condições gastrointestinais simuladas.

Em decorrência disso, torna-se evidente a importância de avaliar a sobrevivência microbiana em condições gastrointestinais, uma vez que a manutenção da viabilidade durante o armazenamento não garante que o micro-organismo resistirá às condições do sistema digestivo após consumo. Sendo assim, o TSGL pode ser considerado um método eficiente para estimar a validade de alimentos que contêm probióticos, de modo a assegurar que estes serão capazes de alcançar seu local de ação após serem consumidos.

6 CONCLUSÕES

- Nas condições ideais de pH e temperatura, os sucos de fruta promoveram crescimento de *L. rhamnosus* mesmo sem a incorporação de aditivos;
- Em relação ao estresse ácido, no pH 4 e no pH 2, ocorreu crescimento ou manutenção da viabilidade celular, exceto para o suco de goiaba, demonstrando o quanto o micro-organismo é robusto;
- A sobrevivência de *L. rhamnosus* ao TSGI foi influenciada pelo meio utilizado e pelo grau de estresse durante a seleção ácida;
- A formulação de bebidas simbióticas, de manga e de maracujá, foi possível com a associação entre *L. rhamnosus* e inulina. Por sua vez, a adição do xilitol possibilitou o enquadramento dos sucos no exigido pela legislação brasileira para o °Brix;
- Dos sucos fermentados produzidos, a formulação contendo inulina e adoçada com xilitol é uma alternativa ao público vegano, diabético e intolerante a lactose;
- O suco de maracujá fermentado, simbiótico e adoçado com xilitol apresentou bom desempenho em estoque refrigerado. No entanto, a não sobrevivência do micro-organismo ao TSGI impede sua utilização;
- Considerando o comportamento no estoque refrigerado e a sobrevivência do micro-organismo ao TSGI, o suco fermentado contendo inulina e xilitol de manga possui maior potencial para ser utilizado como veículo de *L. rhamnosus* ATCC 7469.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ACEVEDO-MARTÍNEZ, E., GUTIÉRREZ-CORTÉS, C., GARCÍA-MAHECHA, M., & DÍAZ-MORENO, C. Evaluation of viability of probiotic bacteria in mango (*Mangifera indica* L. Cv. “Tommy Atkins”) beverage. **DYNA**, 85, 84 – 92, 2018.

AHMED, W., & RASHID, S. Functional and therapeutic potential of inulin: A comprehensive review, *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*. **Food Science and Nutrition**, 1 – 13, 2017.

AIDOO, R. P., AFOAKWA, E. O., & DEWETTINCK, K. Rheological properties, melting behaviours and physical quality characteristics of sugar-free chocolates processed using inulin/polydextrose bulking mixtures sweetened with stevia and thaumatin extracts. **LWT - Food Science and Technology**, 62, 592 – 597, 2015.

AL-ANSARI, M.M., SAHLAH, S. M., & ALHUMAID, A. J. L. Ranjit Singh. Probiotic lactobacilli: Can be a remediating supplement for pandemic COVID-19. *Journal of King Saud University – Science*, 33, 1 – 8, 2021.

ALKHATIB, A., TSANG, C., TISS, A., BAHORUN, T., AREFANIAN, H., BARAKE, R., KHADIR, A., & TUOMILEHTO, J. Functional Foods and Lifestyle Approaches for Diabetes Prevention and Management. **Nutrients**, 9, 1310, 1 – 18, 2017.

ALONSO, S., HERRERO, M., RENDUELES, M., & DÍAZ, M. Physiological heterogeneity in *Lactobacillus casei* fermentations on residual yoghurt whey. **Process Biochemistry**, 49, 732 – 739, 2014.

ALVES, A. E. N., MESSAOUD, G. B., DESOBRY, S. E., COSTA, J. M. C., & RODRIGUES, S. Effect of drying technique and feed flow rate on bacterial survival and physicochemical properties of a non-dairy fermented probiotic juice powder. **Journal of Food Engineering**, 189, 45 – 54, 2016.

ANDRADE, R., SANTOS, E., AZOUBEL, P., & RIBEIRO, E. Increased survival of *Lactobacillus rhamnosus* ATCC 7469 in guava juices with simulated gastrointestinal conditions during refrigerated storage. **Food Bioscience**, 32, 1 – 8, 2019.

ARAÚJO, E.A., CARVALHO, A.F., LEANDRO, E.S., FURTADO, M.M., & MORAES, C.A. Development of a symbiotic cottage cheese added with *Lactobacillus delbrueckii* UFV H2b20 and inulin. **Journal of Functional Foods**, 2, 85 – 89, 2010.

ASGARY, S., RASTQAR, A., & KESHVARI, M. Functional Food and Cardiovascular Disease Prevention and Treatment: A Review. **Journal of the American College of Nutrition**, 1 – 26, 2018.

AXELSSON, L.T., & AHRNE, S. Lactic acid bacteria. **Applied Microbial Systematics**, 367 – 388, 2000.

AZAD, M. A. K., SARKER, M., LI, T., & YIN, J. Probiotic Species in the Modulation of Gut Microbiota: An Overview. **Hindawi BioMed Research International**, 1 – 8, 2018.

BALTHAZAR, C.F., SILVA, H.L.A., ESMERINO, ERICK.A., ROCHA, R.S., MORAES, J., CARMO, M.A.V., AZEVEDO, L., CAMPS, I., K.D ABUD, Y., SANT'ANNA, C., et al. The addition of inulin and *Lactobacillus casei* 01 in sheep milk ice cream. **Food Chemistry**, 1 – 39, 2017.

BARROS, Z.M.P. Desenvolvimento de sucos probióticos termossonicados e pasteurizados de acerola e goiaba. Tese. Universidade Federal de Pernambuco, Recife, Pernambuco, 2020.

BERNARDEAU, M., VERNOUX, J.P, HENRI-DUBERNET, S., & GUÉGUEN, M. Safety assessment of dairy microorganisms: The *Lactobacillus* genus. **International Journal of Food Microbiology**, 126, 278 – 285, 2008.

BLIGH, E.G., & DYER, W. J. A rapid method of total lipid extration and purification. **Canadian Journal Biochemistry Physiological**, 27, 8, 911 – 917, 1959.

BRASIL, 2008. MINISTÉRIO DA SAÚDE. AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. **Alimentos com Alegações de Propriedades Funcionais e ou de Saúde, Novos Alimentos/Ingredientes, Substâncias Bioativas e Probióticos. Lista de alegações de propriedade funcional aprovadas.** Disponível em: www.anvisa.gov.br . Acesso em: 13 de setembro de 2016.

BRASIL, 2016a. MINISTÉRIO DA SAÚDE. AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. Alimentos Com Alegações de Propriedades Funcionais e ou de Saúde. Disponível em: www.brasil.gov.br . Acesso em: 10 de agosto de 2016.

BRASIL, 2016b. Ministério do Desenvolvimento Social e Agrário. ASCOM. **Brasil é o 4º maior consumidor de açúcar do mundo.** Disponível em: <http://www.mds.gov.br/area-de-imprensa>. Acessado em: 15 de julho de 2020.

BRASIL, 2018. MINISTÉRIO DA SAÚDE. AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. **Alimentos Funcionais e Novos Alimentos**. Disponível em: www.anvisa.gov.br . Acesso em: 18 de junho de 2020.

BRIGHENTI, M.D., CARVALHO, C.F., BRIGHENTI, C.R.G., & CARVALHO, S.M. Inversão da sacarose utilizando ácido cítrico e suco de limão para preparo de dieta energética de *Apis mellifera* Linnaeus, 1758. *Ciência e Agrotecnologia*, 35, 2, 297 – 304, 2011.

BURITI, F.C.A., CASTRO, I.A., & SAAD, S.M.I. Viability of *Lactobacillus acidophilus* in synbiotic guava mousses and its survival under in vitro simulated gastrointestinal conditions. *International Journal of Food Microbiology*, 137, 121 – 129, 2010.

CAVALCANTI, A.L., OLIVEIRA, K.F., PAIVA, P.S., DIAS, M.V.R., COSTA, S.K.P., & VIEIRA, F. F. Determinação dos Sólidos Solúveis Totais (°Brix) e pH em Bebidas Lácteas e Sucos de Frutas Industrializados. **Pesquisa Brasileira em Odontopediatria e Clínica Integrada**, 6, 1, 57 – 64, 2006.

CAVICHIOLO, J.C., CONTIERO, L.A.F., & CELESTRINO, R.B., 2020. **Maracujá: Nordeste ainda domina cultivo. Revista Campo & Negócios**. Disponível em: <https://revistacampoenegocios.com.br/maracuja-nordeste-ainda-domina-cultivo/>. Acesso em: 19 de fevereiro de 2021.

CHAMPAGNE, C. P., & GARDNER, N. J. Effect of storage in a fruit drink on subsequent survival of probiotic lactobacilli to gastro-intestinal stresses. **Food Research International**, 41, 539 – 543, 2008.

CHAMPAGNE, C. P., GREEN-JOHNSON, J., RAYMOND, Y., BARRETTE, J., & BUCKLEY, N. Selection of probiotic bacteria for the fermentation of a soy beverage in combination with *Streptococcus thermophilus*. **Food Research International**, 42, 612–621, 2009.

CHANTASIRIWAN, S. Modification of Conventional Sugar Juice Evaporation Process for Increasing Energy Efficiency and Decreasing Sucrose Inversion Loss. *Processes*, 8, 765, 1 – 12, 2020.

CHANG, C.P., & LIEW, S.L. Growth medium optimization for biomass production of a probiotic bacterium, *Lactobacillus rhamnosus* ATCC 7469. **Journal of Food Biochemistry**, 37, 536 – 543, 2012.

CHEN, M.J., TANG, H.Y., & CHIANG, M.L. Effects of heat, cold, acid and bile salt adaptations on the stress tolerance and protein expression of kefir-isolated probiotic *Lactobacillus kefirianofaciens* M1. **Food Microbiology**, 2017.

COLLADO, M. C., ISOLAURI, E., SALMINEN, S., & SANZ, Y. The impact of probiotic on gut health. **Current Drug Metabolism**, 10, 1, 68 – 78, 2009.

COMAN, M. M., CECCHINI, C., VERDENELLI, M. C., SILVI, S., ORPIANESI, C., & CRESCI, A. Functional foods as carriers for SYN BIO®, a probiotic bacteria combination. **International Journal of Food Microbiology**, 157, 3, 346 – 352, 2012.

CORCORAN, B.M., STANTON, C., FITZGERALD, G.F., & ROSS, R.P. Survival of Probiotic *Lactobacilli* in Acidic Environments Is Enhanced in the Presence of Metabolizable Sugars. **Applied and Environmental Microbiology**, 6, 71, 3060 – 3067, 2005.

CORRÊA, R.C.G., PERALTA, R.M., HAMINIUK, C.W.I., MACIEL, G.M., BRACHT, A., & FERREIRA, I.C.F.R. The past decade findings related with nutritional composition, bioactive molecules and biotechnological applications of *Passiflora* spp. (Passion fruit). **Trends in Food Science & Technology**, 1 – 44, 2016.

DARBANDI, A., ASADI, A., GHANAVATI, R., AFIFIRAD, R., EMAMIE, A. D., KAKANJ, M., & TALEBI M. The Effect of Probiotics on Respiratory Tract Infection with Special Emphasis on COVID-19: A Periodic Review during 2010 - 2020. **International Journal of Infectious Diseases**, 2021.

DE ANGELIS, M., BINI, L., PALLINI, V., COCCONCELLI, P. S., & GOBBETTI, M. The acid-stress response in *Lactobacillus sanfranciscensis* CB1. **Microbiology**, 147, 1863 – 1873, 2001.

DE ANGELIS, M., CAGNO, R. D., HUET, C., CRECCHIO, C., FOX, P. F., & GOBBETTI, M. Heat Shock Response in *Lactobacillus plantarum*. **Applied and Environmental Microbiology**, 70, 3, 1336–1346, 2004.

DE MACEDO, R. E. F., PFLANZER JR., S. B., TERRA, N. N., & DE FREITAS, R. J. S. Production of fermented sausage using probiotic *Lactobacillus strains*: quality characteristics. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, 28, 3, 509 – 519, 2008.

DE MACEDO, R. E. F., PLANZER JR, S. B., TERRA, N. N., & FREITAS, R. J. S. Características de culturas lácticas probióticas para uso em produtos cárneos fermentados: sensibilidade aos sais de cura e uso de antibióticos para contagem seletiva. **Boletim do Centro de Pesquisa de Processamento de Alimentos**, Curitiba, 23, 1, 2005.

DESMOND, C., STANTON, C., FITZGERALD, GF, COLLINS, K., & PAUL ROSS, R. Environmental adaptation of probiotic lactobacilli towards improvement of performance during spray drying. **International Dairy Journal**, 12, 183 – 190, 2002.

DORON, S., & SNYDMAN, D. R. Risk and Safety of Probiotics. **Clinical Infectious Diseases**, 60, 29 – 34, 2015.

DORON, S., SNYDMAN D.R., & GORBACH S.L. *Lactobacillus* GG: Bacteriology and Clinical Applications. **Gastroenterology Clinics of North America**, 34, 3, 483 – 498, 2005.

DOSSIÊ EDULCORANTES. Edulcorantes. **Food Ingredients Brasil**, 24, 28 – 52, 2013.

DOUILLARD, F.P., RIBBERA, A., KANT, R., PIETILÄ, T.E., JÄRVINEN, H.M., MESSING, M. et al. Comparative Genomic and Functional Analysis of 100 *Lactobacillus rhamnosus* Strains and Their Comparison with Strain GG. **PLOS Genetics**, 9, 8, 1 – 15, 2013.

EMBRAPA. Produção brasileira de maracujá em 2019. EMPRAMA mandioca e Fruticultura, Cruz das Almas, Bahia, 2019.

EMBRAPA. Sistema de Produção de Goiabas para Pequenos Produtores do Rio Grande do Sul. EMBRAPA Clima Temperado, Pelotas, Rio Grande do Sul, 2015.

EMPRAPA, 2004. EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA SEMI – ÁRIDO SISTEMAS DE PRODUÇÃO. **Cultivo da Mangueira**. Disponível em: www.cpatsa.embrapa.br. Acesso em: 19 de fevereiro de 2021.

ESPINOZA, Y. R., & NAVARRO, Y. G. Non-dairy probiotic products. *Food Microbiology*, 27, 1 – 11, 2010.

FAO/WHO, 2002. Working Group Report on Drafting Guidelines for the Evaluation of Probiotics in Food. London, Ontario, Canada.

FARIAS, N., SOARES, M., & GOUVEIA, E. Enhancement of the viability of *Lactobacillus rhamnosus* ATCC 7469 in passion fruit juice: Application of a central composite rotatable design. **LWT - Food Science and Technology**, 71, 149 – 154, 2016.

FELLOWS, P.J. Food processing technology: principles and practice, Third Edition. Boca Raton: CRC Press, 2009, 895pp.

FERNÁNDES, L. C. Desenvolvimento de sorvetes probióticos à base de extrato solúvel de soja. *Dissertação*. Escola de Engenharia de Lorena da Universidade de São Paulo, Lorena, São Paulo, 2015.

FLACH, J., WAAL, M. V. D., NIEUWBOER, M. V. D., CLAASSEN, E., & LARSEN, O. The underexposed role of food matrices in probiotic products: reviewing the relationship between carrier matrices and product parameters. **Food Science and Nutrition**, 1 – 60, 2017.

FLINT, H. J., SCOTT, K. P., DUNCAN, S. H., LOUIS, P., & FORANO, E. Microbial degradation of complex carbohydrates in the gut. **Gut Microbes**, 3, 4, 289 – 306, 2012.

FREITAS, A. C., RODRIGUES, D., ROCHA-SANTOS, T. A. P., GOMES, A. M. P., & DUARTE, A. C. Marine biotechnology advances towards applications in new functional foods. **Biotechnology Advances**, 30, 1506 – 1515, 2012.

GARCÍA-DIÉGUEZ, C., SALGADO, J. M., ROCA, E., & DOMÍNGUEZ, J. M. Kinetic modelling of the sequential production of lactic acid and xylitol from vine trimming wastes. **Bioprocess and Biosystems Engineering**, 34, 869 – 878, 2011.

GOUVEIA, M.M.A. Avaliação do pH, capacidade tampão, teor de flúor de sucos de frutas industrializados e morfologia e microdureza do esmalte de dentes decíduos erosionados pelo suco de laranja e incubados em saliva artificial: Estudo *in vitro*. *Dissertação*. Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, Santa Catarina, 1999.

GRASSE. Xilitol, aplicações funcionais. **Food Ingredients Brasil**, 22, 1-5, 2012.

HADDAJI, N., KHOUADJA, S., FDHILA, K., KRIFI, B., BEN ISMAIL, M., LAGHA, R., BAKIR, K., & BAKHROUF, A. Acid stress suggests different determinants for polystyrene and HeLa cell adhesion in *Lactobacillus casei*. **Journal of Dairy Science**, 98, 7, 1 – 8, 2015.

HANSEN, P.A., & LESSEL, E.F. The status of the species *Lactobacillus casei* (Orla-Jensen 1916). **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, 21, 69 – 71, 1971.

HIGGINS, K. A. & MATTES, R. D. A randomized controlled trial contrasting the effects of 4 low-calorie sweeteners and sucrose on body weight in adults with

overweight or obesity. **The American Journal of Clinical Nutrition**, 1 – 14, 2019.

HILL, C., GUARNER, F., REID, G., GIBSON, G. R., MERENSTEIN, D. J., POT, B., MORELLI, L., CANANI, R. B., FLINT, H. J., SALMINEN, S., CALDER, P. C., & SANDERS, M. E. The International Scientific Association for Probiotics and Prebiotics consensus statement on the scope and appropriate use of the term probiotic. **Nature Reviews Gastroenterologia e Hepatologia**, 11, 506 – 514, 2014.

HO, M., CHANG, Y. Y., CHANG, W. C., LIN, H. C., MEI-HUNG WANG, M. H., LIN, W. C., & CHIU, T. H. Oral *Lactobacillus rhamnosus* GR-1 and *Lactobacillus reuteri* RC-14 to reduce Group B Streptococcus colonization in pregnant women: A randomized controlled trial. **Taiwanese Journal of Obstetrics & Gynecology**, 55, 515 – 518, 2016.

HOJSAK, I., ABDOVIĆ, S., SZAJEWSKA H., MILOSEVIĆ, M., KRZNARIĆ, Z., & KOLACEK S. *Lactobacillus* GG in the Prevention of Nosocomial Gastrointestinal and Respiratory Tract Infections. **Pediatrics**, 125, 1171 – 1177, 2010.

HOOSHYAR, Y., KENARI, A. A., PAKNEJAD, H., & GANDOMI, H. Effects of *Lactobacillus rhamnosus* ATCC 7469 on Different Parameters Related to Health Status of Rainbow Trout (*Oncorhynchus mykiss*) and the Protection Against *Yersinia ruckeri*. **Probiotics and Antimicrobial Proteins**, 1 – 15, 2020.

HUANG, R., PAN, M., WAN, C., SHAH, N. P., TAO, X., & WEI, H. Physiological and transcriptional responses and cross protection of *Lactobacillus plantarum* ZDY2013 under acid stress. **Journal of Dairy Science**, 99, 1 – 9, 2016.

HYSON, A. D. A Review and Critical Analysis of the Scientific Literature Related to 100% Fruit Juice and Human Health. **Advances in Nutrition**, 6, 37 – 51, 2015.

INSTITUTO ADOLFO LUTZ (IAL). **Métodos físico-químicos para análises de alimentos**, São Paulo, SP, ed. IV, 2008, p. 1020.

JANG, S.O., KIM, H. J., KIM, Y. J., KANG, M. J., KWON, J. W., SEO, J. H., KIM, H. Y., KIM, B. J., YU, J., & HONG, S. J. Asthma prevention by *Lactobacillus rhamnosus* in a mouse model is associated with CD4+CD25+Foxp3+T cells. **Allergy, Asthma and Immunology Research**, 4, 3, 150 – 156, 2012.

JANKET, S. J., BENWAIT, J., ISAAC, P., ACKERSON, L. K., MEURMAN, J. H. Oral and Systemic Effects of Xylitol Consumption. **Caries Research Journal**, 1 – 11, 2019.

JIA, R., CHEN, H., CHEN, H., & DING, W. Effects of fermentation with *Lactobacillus rhamnosus* GG on product quality and fatty acids of goat milk yogurt. **Journal of Dairy Science**, 99, 1, 1 – 7, 2016.

JORJÃO, A. L., DE OLIVEIRA, F. E., LEÃO, M. V. P., CARVALHO, C. A. T., JORGE, A. O. C., & OLIVEIRA, L. D. Live and Heat-Killed *Lactobacillus rhamnosus* ATCC 7469 May Induce Modulatory Cytokines Profiles on Macrophages RAW 264.7. **The Scientific World Journal**, 1 – 6, 2015.

PEREIRA, N.J, 2002. **UFRJ testa adoçante do futuro**. Núcleo de Difusão Científica e Tecnológica. Disponível em: <http://www.faperj.br>. Acesso em: 25 de dezembro de 2020.

KANDLER, O. Carbohydrate metabolism in lactic acid bacteria. **Antonie van Leeuwenhoek**, 49, 209 – 224, 1983.

KARA, S. S., VOLKAN, B., & ERTEN, I. *Lactobacillus rhamnosus* GG can protect malnourished children. **Beneficial Microbes**, 10, 3, 237 – 244, 2019.

KAUR, N., & GUPTA, A. K. Applications of inulin and oligofructose in health and nutrition. **Journal of Biosciences**, 27, 7, 703 – 714, 2002.

KHANI, S., MOTAMEDIFAR, M., GOLMOGHADDAM, H., HOSSEINI, H. M., & HASHEMIZADEH, Z. In vitro study of the effect of a probiotic bacterium *Lactobacillus rhamnosus* against herpes simplex virus type 1. **Brazilian Journal of Infectious Diseases**, 16, 2, 129 – 135, 2012.

KHEZRI, S., MAHMOUDI, R., & DEHGHAN, P. Fig juice Fortified with Inulin and *Lactobacillus Delbrueckii*: A Promising Functional Food. **Applied Food Biotechnology**, 5, 2, 97 – 106, 2018.

KIM, W. S., PERL, L., PARK, J. H., TANDIANUS, J. E., & DUNN, N. W. Assessment of Stress Response of the Probiotic *Lactobacillus acidophilus*. **Current Microbiology**, 43, 5, 346 – 350, 2001.

KOLAČEK, S., HOJSAK, I., BERNI CANANI, R., GUARINO, A., INDRIIO, F., OREL, R., POT, B., SHAMIR, R., SZAJEWSKA, H., VANDENPLAS, Y., VAN GOUDOEVEER, J., & WEIZMAN, Z. Commercial Probiotic Products: A Call for Improved Quality Control. A Position Paper by the ESPGHAN Working Group

for Probiotics and Prebiotics. *Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition*, 65, 1, 117– 124, 2017.

KÖNIG, H., & FRÖHLICH, J. Lactic Acid Bacteria. **Biology of Microorganisms on Grapes, in Must and in Wine**. Springer-Verlag Berlin Heidelberg, 2009, Chapter 1, 1 – 27 p.

KUMAR, B. V., SREEDHARAMURTHY, M., & REDDY, O. V. S. Probiotication of mango and sapota juices using *Lactobacillus plantarum* NCDC LP 20. **Nutrafoods**, 1 – 10, 2015.

LEBAKA, V.R., YOUNG JUNG WEE, Y.J., NARALA, V.R., & JOSHI, V.K. Development of New Probiotic Foods - A Case Study on Probiotic Juices. **Probiotics and Prebiotics**. 2018, Chapter 4, 55 – 74 p.

LI, X. Q., ZHU, Y. H., ZHANG, H. F., YUE, Y., CAI Z. X., LU, Q. P., ZHANG, L., WENG, X.G., ZHANG F. J., ZHOU, D., YANG, J. C., & WANG, J. F. Risks Associated with High-Dose *Lactobacillus rhamnosus* in an *Escherichia coli* Model of Piglet Diarrhoea: Intestinal Microbiota and Immune Imbalances. **PLoS ONE**, 7, 7, 2012.

LIU, D. M., LI, L., YANG, X. Q., LIANG, S. Z., & WANG, J. S. Survivability of *L. rhamnosus* in Soy Cheese. **Food Technol. Biotechnol**, 44, 3, 417 – 422, 2006.
LIVESEY, G. Health potential of polyols as sugar replacers, with emphasis on low glycaemic properties. **Nutrition Research Reviews**, 16, 163 – 191, 2003.

MADIGAN, M.T., MARTINKO, J.M., DUNLAP, P.V., & CLARK, D.P. **Microbiologia de Brock**. 12ª Edição. Porto Alegre: Artmed, 2010, 1160 p.

MANHANI, T. M., CAMPOS, M. V. M., & DONATI, F. P. Sacarose, suas propriedades e os novos edulcorantes. **Revista Uniara**, 17, 1, 2014.

MAPA, 2003. MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E DO ABASTECIMENTO. Instrução Normativa Nº 12, de 4 de setembro de 2003. Disponível em: <https://www.gov.br/>. Acesso em: 24 de janeiro de 2021.

MAPA, 2018. MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO/SECRETARIA DE DEFESA AGROPECUÁRIA. **Instrução Normativa Nº 37, de 1º de outubro de 2018**. Disponível em: www.in.gov.br. Acesso em: 20 de janeiro de 2021.

MARSELLA, R., SANTORO, D., & AHRENS, K. Early exposure to probiotics in a canine model of atopic dermatitis has long-term clinical and immunological

effects. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, 146, 2, 185 – 189, 2012.

MATEJČEKOVÁ, Z., LIPTÁKOVÁ, D., SPODNIÁKOVÁ, S., & VALÍK, L. Characterization of the growth of *Lactobacillus plantarum* in milk in dependence on temperature. **Acta Chimica Slovaca**, 9, 2, 104 – 108, 2016.

MATHIPA, M. G., & THANTSHA, M., S. Cocktails of probiotics pre-adapted to multiple stress factors are more robust under simulated gastrointestinal conditions than their parental counterparts and exhibit enhanced antagonistic capabilities against *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*. **Gut Pathogens**, 7 – 5, 2015.

MILLER, G.L. Use of Dinitrosalicylic Acid Reagent for Determination of Reducing Sugar. **Analytical Chemistry**, 31, 426 – 428, 1959.

MILLS, S., STANTON, C., FITZGERALD, G. F., & ROSS, R. P. Enhancing the stress responses of probiotics for a lifestyle from gut to product and back again. **Microbial Cell Factories**, 10, 1 – 15, 2011.

MIN, M., BUNT, C. R., MASON, S. L., & HUSSAIN, M. A. Non-dairy probiotic food products: An emerging group of functional foods, Critical Reviews in Food Science and Nutrition. **Food Science and Nutrition**, 1 – 16, 2018.

MIREMADI, F., & SHAH, N. P. Applications of inulin and probiotics in health and nutrition. **International Food Research Journal**, 19, 4, 1337 – 1350, 2012.

MISHRA, B. K., HATI, S., DAS, S., & PRAJAPATI, J. B. Biofunctional Attributes and Storage Study of Soy Milk Fermented by *Lactobacillus rhamnosus* and *Lactobacillus helveticus*. **Food Tecnology & Biotechnology**, 57, 3, 339 – 407, 2019.

MOHAMAD, N. L., MUSTAPA KAMAL, S. M., & MOKHTAR, M. N. Xylitol Biological Production: A Review of Recent Studies. **Food Reviews International**, 31, 1, 74 – 89, 2015.

MOKOENA, M. P. Lactic Acid Bacteria and Their Bacteriocins: Classification, Biosynthesis and Applications against Uropathogens: A Mini-Review. **Molecules**, 22, 1255, 1 – 13, 2017.

MONTANARI, S. R., JÚNIOR, B. R C L., MARTINS, M. L., RAMOS, A. M., BINOTI, M. L., CAMPOS, R. C. A. B., CAMPOS, A. N. R., & MARTINS, E. M. F. In vitro gastrointestinal digestion of a peanut, soybean, guava and beet

beverage supplemented with *Lactobacillus rhamnosus* GG. **Food Bioscience**, 36, 1-10, 2020.

MONTORO, B. P., BENOMAR, N., GÓMEZ, N. C., ENNAHAR, S., HORVATOVICH, P., KNAPP, C. W., GÁLVEZ, A., & ABRIOUEL, H. Proteomic analysis of *Lactobacillus pentosus* for the identification of potential markers involved in acid resistance and their influence on other probiotic features. **Food Microbiology**, 1 – 19, 2017.

MUSSATTO, S. I., & ROBERTO, I. C. Xilitol: Edulcorante com efeitos benéficos para a saúde humana. *Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas*, 38, 4, 1 – 13, 2002.

NAZZARO, F., FRATIANNI, F., NICOLAUS, B., POLI, A., & ORLANDO, P. The prebiotic source influences the growth, biochemical features and survival under simulated gastrointestinal conditions of the probiotic *Lactobacillus acidophilus*. **Anaerobe**, 18, 280 – 285, 2012.

NEMATOLLAHI, A., SOHRABVANDI, S., MORTAZAVIAN, A. M., & JAZAERI, S. Viability of probiotic bacteria and some chemical and sensory characteristics in cornelian cherry juice during cold storage. **Electronic Journal of Biotechnology**, 21, 49 – 53, 2016.

NI, D., XU, W., ZHU, Y., ZHANG, W., ZHANG, T., GUANG, C., & MU, W. Inulin and its enzymatic production by inulosucrase: Characteristics, structural features, molecular modifications and applications. **Biotechnology Advances**, 37, 306 – 318, 2019.

NOWAK, B., CISZEK-LENDIA, M., SRÓTTEK, M., GAMIAN, A., KONTNY, E., GÓRSKA-FRĄCZEK, S., & MARCINKIEWICZ, J. *Lactobacillus rhamnosus* exopolysaccharide ameliorates arthritis induced by the systemic injection of collagen and lipopolysaccharide in DBA/1 mice. **Archivum Immunologiae et Therapiae Experimentalis**, 60, 3, 211 – 220, 2012.

NUALKAEKUL, S., SALMERON, I., & CHARALAMPOPOULOS, D. Investigation of the factors influencing the survival of *Bifidobacterium longum* in model acidic solutions and fruit juices. **Food Chemistry**, 129, 3, 1037 – 1044, 2011.

ORLA-JENSEN, S. The lactic acid bacteria. E. Munksgaard, Kldbenhavn, 1919.

OROZCO-PARRA, J., MEJÍA, C. M., & VILLA, C. C. Development of a bioactive synbiotic edible film based on cassava starch, inulin, and *Lactobacillus casei*. *Food Hydrocolloids*, 104, 1 – 8, 2020.

OZOGUL, F., YAZGAN, H., & OZOGUL, Y. Lactic Acid Bacteria: *Lactobacillus* spp.: *Lactobacillus acidophilus*. Reference Module in Food Science, 1 – 11, 2020.

PATUSSI, E.G. Avaliação da dureza do esmalte de dentes decíduos, expostos a dois sucos de laranja industrializados: estudo *in vitro*. *Dissertação*. Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, Santa Catarina, 2003.

PEREIRA, A.L.F., & RODRIGUES, S. Turning fruit juice into probiotic beverages. **Fruit Juices**. 2018, Chapter 15, 279 – 287 p.

PIMENTEL, T. C., DA COSTA, W. K. A., EDUARDO BARÃO, C., ROSSET, M., & MAGNANI, M. Vegan probiotic products: a modern tendency or the newest challenge in functional foods. **Food Research International**, 1 – 44, 2020.

PIMENTEL, T. C., KLOSOSKI, S. J., ROSSET, M., BARÃO, C. E., & MARCOLINO, V. A. Fruit Juices as Probiotic Foods. **Sports and Energy Drinks**, 483 – 513, 2019.

PIMENTEL, T. C., MADRONA, G. S., GARCIA, S., & PRUDENCIO, S. H. 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 - Food Science and Technology**, 63, 415 – 422, 2015.

RAFTER, J., BENNETT, M., CADERNI, G., CLUNE, Y., HUGHES, R., KARLSSON, P. C., KLINDER, A., O'RIORDAN, M., O'SULLIVAN, G. C., POOL-ZOBEL, B., RECHKEMMER, G., et al. Dietary synbiotics reduce cancer risk factors in polypectomized and colon cancer patients. **The American Journal of Clinical Nutrition**, 85, 488 – 496, 2007.

RIVAS, B., TORRADO, A., RIVAS, S., MOLDES, A. B., & DOMÍNGUEZ, J. D. Simultaneous lactic acid and xylitol production from vine trimming wastes. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, 87, 1603 – 1612, 2007.

RODRÍGUEZ, L.G. R, GASGA, V. M. Z., PESCUA, M., NIEUWENHOVE, C. V., MOZZI, F., & BURGOS, J. A. S. 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**, 1 – 48, 2020.

ROLIM, P. M. Development of prebiotic food products and health benefits. **Food Science and Technology**, 35, 1, 3 – 10, 2015.

ROOBAB, U., BATOOL, U., MANZOOR, M. F., SHABBIR, M. A., KHAN, M. R., & AADIL, R. M. Sources, formulations, advanced delivery and health benefits of probiotics. **Current Opinion in Food Science**, 32, 17 – 28, 2020.

ROSSI, F., AMADORO, C., & COLAVITA, G. Members of the *Lactobacillus* Genus Complex (LGC) as Opportunistic Pathogens: A Review. **Microorganisms**, 7, 126, 1 – 15, 2019.

RUNGSRI, P., AKKARACHANEEYAKORN, N., WONGSUWANLERT, M., PIWAT, S., NANTARAKCHAIKUL, P., & TEANPAISAN, R. Effect of fermented milk containing *Lactobacillus rhamnosus* SD11 on oral microbiota of healthy volunteers: A randomized clinical trial. **Journal of Dairy Science**, 100,10, 7780 – 7787, 2017.

SAAD, S. M. I. Probióticos e prebióticos: o estado da arte. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, 42, 1, 1 – 16, 2006.

SAARELA, M., RANTALA, M., HALLAMAA, K., NOHYNEK, L., VIRKAJÄRVI, L., & MATTO, J. Stationary-phase acid and heat treatments for improvement of the viability of probiotic lactobacilli and bifidobacterial. **Journal of Applied Microbiology**, 96, 1205 – 1214, 2004.

SALLI, K., LEHTINEN, M. J., TIIHONEN, K., & OUWEHAND, A. C. Xylitol's Health Benefits beyond Dental Health: A Comprehensive Review. **Nutrients**, 11, 1813, 1 – 19, 2019.

SANTOS FILHO, A.L., FREITAS, H.V., RODRIGUES, S., GONÇALVES ABREU, V. K., DE OLIVEIRA LEMOS, T., GOMES, W.F., NARAIN, N., & FERNANDES PEREIRA, A.L. Production and stability of probiotic cocoa juice with sucralose as sugar substitute during refrigerated storage. **LWT - Food Science and Technology**, 99, 371 – 378, 2019.

SANTOS, C. C. A DO A., LIBECK, B. DA S., & SCHWAN, R. F. Co-culture fermentation of peanut-soy milk for the development of a novel functional beverage. **International Journal of Food Microbiology**, 186, 32 – 41, 2014.

SANTOS, E., ANDRADE, R., & GOUVEIA, E. Utilization of the pectin and pulp of the passion fruit from Caatinga as probiotic food carriers. **Food Bioscience**, 20, 56 – 61, 2017.

SATO, T., KUSUHARA, S., YOKOI, W., ITO, M., & MIYAZAKI, K. Prebiotic potentialof L-sorbose and xylitol in promoting the growth and metabolic activity

of specific butyrate-producing bacteria in human fecal culture. **FEMS Microbiology Ecology**, 1 – 20, 2016.

SHEWALE, R. N., SAWALE, P. D., KHEDKAR, C. D., & SINGH, A. Selection criteria for probiotics: A review. **International Journal of Probiotics and Prebiotics**, 9, 1, 2014.

SHI, H., KRAFT, J., & GUO, M. Physicochemical and microstructural properties and probiotic survivability of symbiotic almond yogurt alternative using polymerized whey protein as a gelation agent. *Institute of Food Technologists*, 00, 0, 1 – 9, 2020.

SHORI, A. B. Antioxidant activity and viability of lactic acid bacteria in soybean-yogurt made from cow and camel milk. **Journal of Taibah University for Science**, 7, 202 – 208, 2013.

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

SILVA, A. C. C., DA SILVA, N. A., PEREIRA, M. C. S., & VASSIMON, H. S. Foods containing functional ingredients in its formulation are healthy? A review of article published in Brazilian journals. **Revista Conexão Ciência**, 11, 2, 133 – 144, 2016.

SIMS, I. M., RYAN, J. L. J., & KIM, S. H. In vitro fermentation of prebiotic oligosaccharides by *Bifidobacterium lactis* HN019 and *Lactobacillus* spp. **Anaerobe**, 25, 11 – 17, 2014.

SINGH, K., & RAO, A. Probiotics: A potential immunomodulator in COVID-19 infection management. **Nutrition Research**, 87, 1 – 12, 2021.

SLAVIN, J. Fiber and Prebiotics: Mechanisms and Health Benefits. **Nutrients**, 5, 1417-1435, 2013.

SODERLING, E. M., EKMAN, C. T., & TAIPALE, T. J. Growth Inhibition of *Streptococcus mutans* with Low Xylitol Concentrations. **Current Microbiology**, 56, 382 – 385, 2008.

SOUKOULIS, C., BEHBOUDI-JOBBEHDAR, S., YONEKURA, L., PARMENTER, C., & FISK, I. D. Stability of *Lactobacillus rhamnosus* GG in prebiotic edible films. **Food Chemistry**, 159, 302 – 308, 2014.

STREIT, F., DELETTRE, J., CORRIEU, G., & BÉAL, C. Acid adaptation of *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* induces physiological responses at membrane and cytosolic levels that improves cryotolerance. **Journal of Applied Microbiology**, 105, 4, 1071–1080, 2008.

SU OH, N., KIM, K., OH, S., & KIM, Y. Enhanced Production of Galactooligosaccharides Enriched Skim Milk and Applied to Potentially Synbiotic Fermented Milk with *Lactobacillus rhamnosus* 4B15. **Food Science of Animal Resources**, 39, 5, 725 – 741, 2019.

SUCCI, M., TREMONTE, P., REALE, A., SORRENTINO, E., GRAZIA, L., PACIFICO, S., & COPPOLA, R. Bile salt and acid tolerance of *Lactobacillus rhamnosus* strains isolated from Parmigiano Reggiano cheese. **FEMS Microbiology Letters**, 244, 129 – 137, 2005.

SUEZ, J., ZMORA, N., SEGAL, E., & ELINAV, E. The pros, cons, and many unknowns of probiotics. **Nature Medicine**, 25, 716 – 729, 2019.

SUMERI, I., ARIKE, L., STEKOLŠTŠIKOVA, J., UUSNA, R., ADAMBERG, S., ADAMBERG, K., & PAALME, T. Effect of stress pretreatment on survival of probiotic bacteria in gastrointestinal tract simulator. **Applied Microbiology and Biotechnology**, 86, 1925 – 1931, 2010.

TANWAR, B., ANDALLU, B., & CHANDEL, S. Influence of Processing on Physicochemical and Nutritional Composition of *Psidium Guajava* L. (Guava) Products. **International Journal of Agriculture and Food Science Technology**, 5, 2, 47 – 54, 2014.

TYNKKYNEN, S., SATOKARI, R., SAARELA, M., MATTILA-SANDHOLM, T., & SAXELIN, M. Comparison of Ribotyping, Randomly Amplified Polymorphic DNA Analysis, and Pulsed-Field Gel Electrophoresis in Typing of *Lactobacillus rhamnosus* and *L. casei* Strains. **Applied Environmental Microbiology**, 65, 3908 – 3914, 1999.

UEBANSO, T., KANO, S., YOSHIMOTO, A., NAITO, C., SHIMOHATA, T., MAWATARI, K., & TAKAHASHI, A. Effects of Consuming Xylitol on Gut Microbiota and Lipid Metabolism in Mice. **Nutrients**, 9, 756, 1 – 12, 2017.

UR-REHMAN, S., MUSHTAQ, Z., ZAHOOOR, T., JAMIL, A., & MURTAZA, M. A. Xylitol: A Review on Bioproduction, Application, Health Benefits, and Related Safety Issues. **Food Science and Nutrition**, 55, 11, 1514 – 1528, 2015.

VALENZUELA, J. F., PINUER, L. A., CANCINO, A. G., & YÁÑEZ, R. B. Metabolic Fluxes in Lactic Acid Bacteria—A Review. **Food Biotechnology**, 29, 185 – 217, 2015.

VALÍK, L., MEDVEĐOVÁ, A., & LIPTÁKOVÁ, D. Characterization of the growth of *Lactobacillus rhamnosus* GG in milk at suboptimal temperatures. **Journal of Food and Nutrition Research**, 47, 60 – 67, 2008.

VANDENPLAS, Y., HUYS, G., & DAUBE, G. Probiotics: an update. **Jornal de Pediatria**, 91, 1, 6 – 21, 2015.

VIEIRA, K. C. O., FERREIRA, C. S., BUENO, E. B. T., MORAES, Y. A., TOLEDO, A. C. C. G., NAKAGAKI, W. R., PEREIRA, V. C., & WINKELSTROTER, L. K. Development and viability of probiotic orange juice supplemented by *Pediococcus acidilactici* CE51. **LWT - Food Science and Technology**, 130, 1 – 7, 2020.

VIVARELLI, S., SALEMI, R., CANDIDO, S., FALZONE, L., SANTAGATI, M., STEFANI, S., TORINO, F., BANNA, G. L., TONINI, G., & LIBRA, M. Gut Microbiota and Cancer: From Pathogenesis to Therapy. **Cancers**, 11, 38, 2019.

VORAGE, L., WISEMAN, N., GRACA, J., & HARRIS, N. The Association of Demographic Characteristics and Food Choice Motives with the Consumption of Functional Foods in Emerging Adults. **Nutrients**, 12, 2582, 1 – 13, 2020.

WANG, C., CUI, Y., & QU, X. Mechanisms and improvement of acid resistance in lactic acid Bacteria. **Arch Microbiol**, 2017.

WANG, C., LIANG, S., WANG, H., & GUO, M. Physiochemical properties and probiotic survivability of symbiotic oat-based beverage. **Food Sci Biotechnol**, 1 – 9, 2017.

WILKINS, T., & SEQUOIA, J. Probiotics for Gastrointestinal Conditions: A Summary of the Evidence. **American Family Physician**, 96, 3, 170 – 178, 2017.

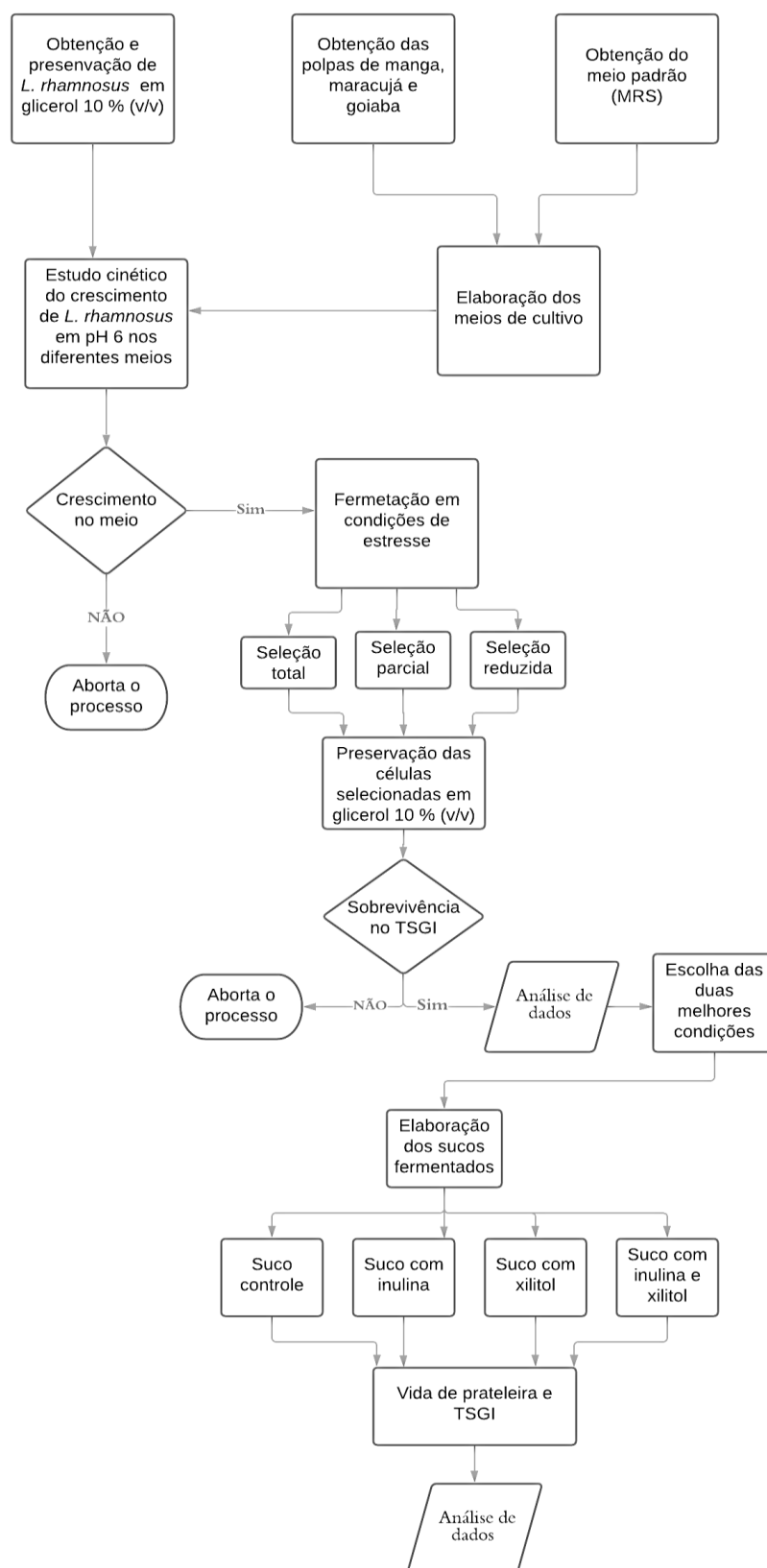
YAZDANKHAH, S., GRAHEK-OGDEN, D., ECKNER, K., KAPPERUD, G., LASSEN, J., NARVHUS, J., NESBAKKEN, T., ROBERTSON, L., ROSNES, J. T., OLAUG TARAN SKJERDAL, SKJERVE, E., VOLD, L., & WASTESON, Y. Risk Assessment of Specific Strains of *Lactobacillus rhamnosus* Used as "Other Substances". **European Journal of Nutrition & Food Safety**, 9, 4, 315 – 316, 2019.

YUASA M., SHIMADA A., MATSUZAKI A., EGUCHI A. & TOMINAGA M.
Chemical composition and sensory properties of fermented citrus juice using
probiotic lactic acid bacteria. **Food Bioscience**, 1 – 20, 2020.

ZAHARAN, W. E., ELSONBATY, S. M., & MOAWED, F. S.M. *Lactobacillus*
rhamnosus ATCC 7469 exopolysaccharides synergizes with low level ionizing
radiation to modulate signaling molecular targets in colorectal carcinogenesis in
rats. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, 92, 384–393, 2017.

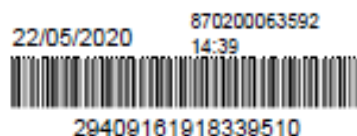
ZHU, Y. H., LI, X. Q., ZHANG, W., ZHOU, D., LIU, H. Y., & WANG, J. F.
Dose-Dependent Effects of *Lactobacillus rhamnosus* on Serum Interleukin-17
Production and Intestinal T-Cell Responses in Pigs Challenged with *Escherichia*
coli. **Applied and Environmental Microbiology**, 80, 5, 1787–1798, 2014.

APÊNDICE A - FLUXOGRAMA DA ELABORAÇÃO DOS SUCOS PROBIÓTICOS FERMENTADOS



Fonte: A autora (2021).

APÊNDICE B - PEDIDO DE PATENTE

**Pedido nacional de Invenção, Modelo de Utilidade, Certificado de Adição de Invenção e entrada na fase nacional do PCT****Número do Processo:** BR 10 2020 010290 7**Dados do Depositante (71)**

Depositante 1 de 1**Nome ou Razão Social:** UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO**Tipo de Pessoa:** Pessoa Jurídica**CPF/CNPJ:** 24134488000108**Nacionalidade:** Brasileira**Qualificação Jurídica:** Instituição de Ensino e Pesquisa**Endereço:** Av. Prof. Moraes Rego, 1235 - Cidade Universitária**Cidade:** Recife**Estado:** PE**CEP:** 50670-901**País:** Brasil**Telefone:** (81)2126 8959**Fax:** (81)2126 8959**Email:** patentes_dine.propesq@ufpe.br

Dados do Pedido

Natureza Patente: 10 - Patente de Invenção (PI)

Título da Invenção ou Modelo de Utilidade (54): PROCESSO DE SELEÇÃO DE *L. rhamnosus* ATCC 7469 EM GRADIENTE ÁCIDO E MATRIZ VEGETAL PARA OBTENÇÃO DE CÉLULAS MAIS RESISTENTES AO TRATO GASTROINTESTINAL E DESENVOLVIMENTO DE UM PRODUTO A PARTIR DAS CÉLULAS SELECIONADAS

Resumo: A presente invenção de patente trata tanto de um processo de seleção em gradiente ácido em suco de maracujá para obtenção de células mais resistentes as condições gástricas e intestinais quanto da formulação de bebida funcional fermentada de maracujá pela ação fermentativa das células selecionadas. A obtenção de células mais resistentes as condições gastrointestinais, partiu da utilização de gradiente ácido em meio à base de maracujá. O processo desenvolvido é simples, econômico, de fácil operação e garante maior sobrevivência de *L. rhamnosus* ATCC 7469 as condições gástricas e intestinais. Além disso, a utilização de meio à base de maracujá, garante que posteriormente o microrganismo possa ser utilizado na elaboração de uma bebida funcional a partir da mesma fruta. Por sua vez, a bebida gerada é caracterizada especialmente por conter as células pré-selecionadas e polpa de maracujá, sendo assim um produto nutricionalmente rico e que pode ser consumido sem restrição pela população. Podendo assim, ser uma alternativa para o consumo de alimentos probióticos, especialmente para alérgicos ou intolerantes a lactose, uma vez que não contém em sua composição leite nem seus derivados. Deste modo, a presente invenção tem potencial aplicação no setor de desenvolvimento de produtos funcionais não lácteos.

Figura a publicar: 1