

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM NUTRIÇÃO

THAÍSA GABRIELA SILVA DE FARIAS

EFEITO DO FRUTO-OLIGOSSACARÍDEO SOBRE A VIABILIDADE DE
***Lactobacillus* spp. PARA APLICAÇÃO EM SUCO DE ABACAXI**

RECIFE

2021

THAÍSA GABRIELA SILVA DE FARIAS

**EFEITO DO FRUTO-OLIGOSSACARÍDEO SOBRE A VIABILIDADE DE
Lactobacillus spp. PARA APLICAÇÃO EM SUCO DE ABACAXI**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Nutrição do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal de Pernambuco, na área de concentração Ciência dos Alimentos, para obtenção do título de Doutor em Nutrição.

Orientadora: Prof. Dra. Tânia Lúcia Montenegro Stamford

Co-orientadora: Prof. Dra. Thatiana Montenegro Stamford Arnaud

RECIFE-PE

2021

Catálogo na fonte:
Bibliotecária: Elaine Freitas, CRB4:1790

F224e	Farias, Thaísa Gabriela Silva de Efeito do fruto-oligossacarídeo sobre a viabilidade de <i>Lactobacillus</i> spp. para aplicação em suco de abacaxi / Thaísa Gabriela Silva de Farias. – 2022. 101 f. : il. Orientadora: Tânia Lúcia Montenegro Stamford. Coorientadora: Thatiana Montenegro Stamford Arnaud. Tese (doutorado) – Universidade Federal de Pernambuco. Centro de Ciências da Saúde. Programa de Pós-Graduação em Nutrição. Recife, 2022. Inclui referências e apêndices. 1. Probióticos. 2. Alimento funcional. 3. Fibras na Dieta. 4. Microbiologia industrial. I. Stamford, Tânia Lúcia Montenegro. (orientadora) II. Arnaud, Thatiana Montenegro Stamford (coorientadora). III. Título. 612.3 CDD (23.ed.) UFPE (CCS 2022 - 212)
-------	--

THAÍSA GABRIELA SILVA DE FARIAS

**EFEITO DO FRUTO-OLIGOSSACARÍDEO SOBRE A VIABILIDADE DE
Lactobacillus spp. PARA APLICAÇÃO EM SUCO DE ABACAXI**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Nutrição do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal de Pernambuco, na área de concentração Ciência dos Alimentos, para obtenção do título de Doutor em Nutrição.

Aprovada em: 28/06/2021

Banca examinadora:

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

Prof^a. Dr^a. Michelle Galindo de Oliveira
Universidade Federal de Pernambuco

Prof^a. Dr^a. Natalia Ferrão Castelo Branco Melo
Universidade Federal de Pernambuco

Prof^a. Dr^a. Celiane Gomes Maia da Silva
Universidade Federal Rural de Pernambuco

Prof^a. Dr^a. Luciana de Oliveira Franco
Universidade Federal Rural de Pernambuco

AGRADECIMENTOS

Porque dEle, por Ele e para Ele são todas as coisas (Romanos 11.36). Portanto, meu primeiro agradecimento é a Ele, o meu Deus, que tornou todas as coisas possíveis e, graças a Ele, é que posso agradecer a todas as pessoas citadas aqui nessa página (e muitas outras que não couberam).

Agradeço aos meus pais, Lindinalda e Adolfo, por me permitirem sonhar tão alto e fazerem todo o possível para o meu bem. Pela presença com a mais sincera alegria nas conquistas e no apoio incondicional nas dificuldades. Espero um dia poder retribuir o tanto que vocês fizeram/fazem por mim.

A minhas amigas Karine, Samyres e Mylena, que tanto me incentivaram e me ouviram ao longo dos quatro anos. Pela amizade, leveza, companhia, paciência e orações, tão necessárias! Obrigada por carregar meus fardos comigo.

À Tia Glória e ao grupo de oração (Pr. Admilson e irmãs Bia e Zefinha), que sempre me acolheram e oraram durante esses quatro anos.

Meu amorzinho Gabriel, meu primo de dois aninhos, quase um irmão mais novo que todo mundo pensa que é meu filho, é motivo de gratidão. Por ter transformado nossa vida nos dias que morou conosco, porque ele é o bebê mais feliz do mundo!

A Alberto, meu amigo mais inteligente e dedicado, que por horas fez as vezes de co-orientador e me ajudou tanto, dentro e fora do laboratório. Já estou com saudade de trocar material estéril e dos dias que passamos com Penha, com quem formamos o trio “Ratos do Laboratório”.

Professoras Tânia, Thayza e Thatiana: MUITO obrigada. Vocês são as pessoas mais queridas de toda a UFPE. Não tenho palavras pra agradecer o apoio, acolhimento e carinho de vocês. Vocês são exatamente o que a ciência do Brasil precisa: conhecimento aliado à humanidade. Jamais imaginaria encontrar orientadoras tão maravilhosas em minha vida acadêmica. Que Deus abençoe vocês cada dia mais e frutifique esse trabalho brilhante de tantos anos.

Agradeço também a Bruno de Veras pela gentileza e disponibilidade nas análises.

Ao Laboratório de Experimentação e Análise de Alimentos (LEAAL), nas pessoas de Camilo e Vivaldo, grandes profissionais que têm sido grandes parceiros do nosso grupo de pesquisa.

A todas as professoras participantes da banca, que sempre com muita

gentileza trazem as melhores sugestões e seus olhares sobre o trabalho.

A Cecília, Andrea e todos os integrantes do Programa de Pós-Graduação em Nutrição pela atenção sempre a mim despendida.

À Fundação de Amparo à Ciência e Tecnologia de Pernambuco (FACEPE) pela bolsa concedida.

Quero registrar um “muito obrigada” também a todos os profissionais de saúde e da pesquisa que têm dedicado suas vidas no combate dessa terrível pandemia.

A todos que acreditaram em mim mais do que eu mesma.

RESUMO

O aumento do consumo de bebidas simbióticas deve-se aos benefícios trazidos à saúde, sendo necessário comprovar seus efeitos. A maioria desses produtos é láctea, o que impede o consumo por indivíduos com restrições alimentares. O uso de frutas é uma opção promissora nessa área. Este estudo propôs-se a identificar características de funcionalidade e potencial biotecnológico de *Lactobacillus rhamnosus*, *L. casei* e *L. acidophilus*, sua viabilidade na presença de fruto-oligossacarídeo (FOS) e elaborar suco de abacaxi (*Ananas cosmosus* L.) com potencial simbiótico. As cepas foram avaliadas quanto à sua viabilidade, resistência ao trato gastrointestinal, atividade antimicrobiana e antioxidante, com e sem FOS e quanto à produção de enzimas de interesse industrial. Observou-se que 1,5% de FOS promoveu aumento nas contagens de todas as espécies estudadas. Com relação à simulação da digestão, *L. rhamnosus* apresentou adequada taxa de sobrevivência, mesmo sem FOS. Com *L. casei* evidenciou-se que a adição de 1,5% de FOS é capaz de promover proteção significativa no ambiente gastrointestinal simulado. Nenhuma das cepas apresentou atividade antioxidante ou antimicrobiana. As três bactérias foram capazes de produzir amilase, protease, lipase e celulase. Considerando a soma de resultados, *L. casei* foi escolhido para adição ao suco de abacaxi contendo 1,5% de FOS. O suco foi avaliado físico-química e microbiologicamente por 14 dias. O suco apresentou relativa estabilidade no pH e acidez titulável, porém com redução dos sólidos solúveis, quando comparado ao controle. Verificou-se que durante o armazenamento ocorreu crescimento da viabilidade do microrganismo. Apesar do aumento numérico, *L. casei* apresentou resultados insatisfatórios na simulação gastrointestinal nos tempos avaliados, indicando avaria celular significativa após exposição ao suco. É possível concluir que a produção de substâncias que tornam um microrganismo probiótico é cepa-dependente e as três espécies estudadas produzem enzimas de interesse econômico. O suco de abacaxi adicionado de FOS é um bom substrato para a multiplicação do *L. casei*, porém é necessário otimizar as condições para a sua sobrevivência ao trato gastrointestinal, para que possa ser considerado como alimento simbiótico.

Palavras-chaves: probiótico; alimentos funcionais; fibra alimentar; microbiologia industrial.

ABSTRACT

The increased consumption of symbiotic drinks is due to the benefits brought to health, and it is necessary to prove their effects. Most of these products are dairy, which makes consumption difficult for individuals with dietary restrictions. The use of fruits is a promising option in this area. This study aimed to identify characteristics of functionality and biotechnological potential of *Lactobacillus rhamnosus*, *L. casei* and *L. acidophilus*, their viability in the presence of fructooligosaccharide (FOS) and to elaborate pineapple juice (*Ananas cosmosus* L.) with symbiotic potential. The strains were evaluated for their viability, resistance to the gastrointestinal tract, antimicrobial and antioxidant activity, with and without FOS, and for the production of enzymes of industrial interest. It was observed that 1.5% of FOS promoted an increase in the counts of all species studied. Regarding the digestion simulation, *L. rhamnosus* showed an adequate survival rate, even without FOS. With *L. casei* it was shown that the addition of 1.5% FOS is able to provide significant protection in the simulated gastrointestinal environment. None of the strains showed antioxidant or antimicrobial activity. The three bacteria were able to produce amylase, protease, lipase and cellulase. Considering the sum of results, *L. casei* was chosen for addition to pineapple juice containing 1.5% FOS. The juice was evaluated physicochemically and microbiologically for 14 days. The juice showed relative stability in pH and titratable acidity, but with a reduction in soluble solids, when compared to the control. It was found that during storage the viability of the microorganism increased. Despite the numerical increase, *L. casei* presented unsatisfactory results in the gastrointestinal simulation in the evaluated times, indicating significant cell damage after exposure to the juice. It is possible to conclude that the production of substances that make a microorganism probiotic is strain-dependent and the three species studied produce enzymes of economic interest. Pineapple juice added with FOS is a good substrate for the multiplication of *L. casei*, but it is necessary to optimize the conditions for its survival in the gastrointestinal tract, so that it can be considered as a

symbiotic food.

Keywords: probiotics; functional food; dietary fiber; industrial microbiology.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Métodos adotados para caracterização físico-química das bebidas funcionais durante armazenamento, de acordo com o IAL (2008).....	48
Tabela 2 – Viabilidade celular de <i>Lactobacillus</i> spp. em diferentes concentrações de fruto-oligossacarídeo.....	50
Tabela 3 – Screening de enzimas de interesse industrial.....	51
Tabela 4 – Perfil de suscetibilidade aos antibióticos clínicos através de medição dos halos de inibição (mm).....	56
Tabela 5 – Perfil de suscetibilidade aos antibióticos: interpretação.....	57
Tabela 6 – Viabilidade de células livres de <i>Lactobacillus rhamnosus</i> ATCC 53103 com diferentes concentrações FOS aos sucos gástrico e intestinal simulados.....	58
Tabela 7 – Viabilidade de células livres de <i>Lactobacillus casei</i> ATCC 334 com diferentes concentrações FOS aos sucos gástrico e intestinal simulados.....	69
Tabela 8 – Viabilidade de células livres de <i>Lactobacillus acidophilus</i> ATCC 4356 com diferentes concentrações de FOS aos sucos gástrico e intestinal simulados.....	61
Tabela 9 – Resultado das análises físico-químicas obtidos durante estocagem do suco de abacaxi.....	65
Tabela 10 – Viabilidade do <i>L. casei</i> durante simulação do trato gastrointestinal ao longo do armazenamento do suco de abacaxi com potencial simbiótico.....	69

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária

APHA – American Public Health Association

ATCC – American Type Culture Collection

BLAST – Basic Local Alignment Search Tool

CEASA-PE – Centro de Abastecimento e Logística de Pernambuco

CCS – Centro de Ciências da Saúde (UFPE)

FAO/WHO – Food and Agriculture Organization (Organização das Nações Unidas para Alimentação e Agricultura)/World Health Organization (Organização Mundial de Saúde)

FOS – Fruto-oligossacarídeo

IAL – Instituto Adolfo Lutz

MRS – (ágar ou caldo) de Man, Rogosa e Sharpe

PCR – Reação em cadeia da polimerase

RDC – Resolução da Diretoria Colegiada

RPMI – Roswell Park Memorial Institute

SGS – Suco gástrico simulado

SIS – Suco intestinal simulado

SLC - Sobrenadante Livre de Células

TCLE – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

UFC – Unidades formadoras de colônia

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	14
2	REVISÃO DA LITERATURA	16
2.1	ALIMENTOS FUNCIONAIS.....	16
2.2	PROBIÓTICOS.....	16
2.2.1	<i>Lactobacillus rhamnosus</i>	18
2.2.2	<i>Lactobacillus acidophilus</i>	19
2.2.3	<i>Lactobacillus casei</i>	20
2.3	POTENCIAL BIOTECNOLÓGICO DOS PROBIÓTICOS	21
2.3.1	<i>Amilase</i>	21
2.3.2	<i>Protease</i>	22
2.3.3	<i>Celulase</i>	23
2.3.4	<i>Lipase</i>	23
2.3.5	<i>Inulinase</i>	24
2.4	PREBIÓTICOS: FRUTO-OLIGOSSACARÍDEOS	24
2.5	SIMBIÓTICOS.....	26
2.6	ABACAXI	28
2.7	PRODUTOS TROPICAIS FUNCIONAIS VIABILIDADE	29
3	HIPÓTESE	32
4	OBJETIVOS	33
4.1	OBJETIVO GERAL	33
4.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	33
5	MÉTODOS	34
5.1	LOCAL E PERÍODO DO ESTUDO	34
5.2	CULTURA DE <i>Lactobacillus spp.</i>	34
5.3	CONTAGEM DE CÉLULAS VIÁVEIS.....	35
5.4	IDENTIFICAÇÃO GENÉTICA DAS CEPAS.....	35
5.5	VIABILIDADE CELULAR NA PRESENÇA DE FRUTO-OLIGOSSACARÍDEO.....	36

5.6	ATIVIDADE ANTIMICROBIANA.....	36
5.6.1	<i>Teste de difusão em ágar.....</i>	36
5.6.2	<i>Microdiluição do líquido metabólico em placa de 96 poços</i>	37
5.6.3	<i>Atividade antagônica por co-incubação.....</i>	38
5.7	SCREENING DE ENZIMAS DE POTENCIAL BIOTECNOLÓGICO	38
5.7.1	<i>Detecção de amilase</i>	39
5.7.2	<i>Detecção de protease.....</i>	39
5.7.3	<i>Detecção de celulase.....</i>	40
5.7.4	<i>Detecção de lipase</i>	40
5.7.5	<i>Detecção de inulinase</i>	41
5.8	TESTE DE SUSCETIBILIDADE A ANTIBIÓTICOS	42
5.9	SOBREVIVÊNCIA ÀS CONDIÇÕES GASTRINTESTINAIS	42
5.10	ATIVIDADE ANTIOXIDANTE	44
5.11	ELABORAÇÃO DO SUCO POTENCIALMENTE SIMBIÓTICO.....	46
5.11.1	<i>Adição de L. casei.....</i>	46
5.12	DETERMINAÇÃO DA COMPOSIÇÃO CENTESIMAL DOS SUCOS	46
5.13	CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA E MICROBIOLÓGICA DAS BEBIDAS FUNCIONAIS DURANTE ARMAZENAMENTO....	47
5.14	ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	48
6	RESULTADOS E DISCUSSÃO	49
6.1	IDENTIFICAÇÃO MOLECULAR.....	49
6.2	VIABILIDADE CELULAR NA PRESENÇA DE FRUTOLIGOSSACARÍDEO <i>in vitro</i>	49
6.3	SCREENING DE ENZIMAS DE INTERESSE INDUSTRIAL.....	51
6.4	ATIVIDADE ANTIMICROBIANA	53
6.5	PERFIL DE SUSCETIBILIDADE A ANTIMICROBIANOS.....	56
6.6	CONDIÇÕES GASTRINTESTINAIS SIMULADAS.....	58

6.7	ATIVIDADE ANTIOXIDANTE.....	64
6.8	SUCO DE ABACAXI COM POTENCIAL SIMBIÓTICO.....	64
6.8.1	<i>Avaliação físico-química do suco</i>	65
6.8.2	<i>Viabilidade de L. casei no suco</i>	66
6.8.3	<i>Viabilidade de L. casei no suco em simulação do trato gastrointestinal.....</i>	68
7	CONSIDERAÇÕES FINAIS	73
	REFERÊNCIAS.....	74
	APÊNDICE A – ARTIGO PUBLICADO NO PERIÓDICO LWT.....	100
	APÊNDICE B – CAPÍTULO PUBLICADO NO LIVRO “AVANÇOS EM CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE ALIMENTOS – VOLUME 4”.....	101

1 INTRODUÇÃO

Probióticos podem ser definidos como “microrganismos vivos que, quando administrados em quantidades adequadas, conferem benefícios à saúde do hospedeiro” (HILL et al., 2014). Estes microrganismos têm sido amplamente adicionados em produtos alimentícios denominados “alimentos funcionais” (LU et al., 2018) e movimentou US\$ 8.2 bilhões apenas em 2019, e espera-se que com a expansão de seu consumo, o mercado fature cerca de US\$ 95 bilhões por volta de 2028 (GRAND VIEW RESEARCH, 2021).

Os benefícios exercidos pelos probióticos incluem sua capacidade de prevenir e tratar infecções intestinais, estimular o sistema imunológico, aumentar a utilização da lactose em indivíduos intolerantes, atuar no controle dos níveis de colesterol sérico e na prevenção de alergias, além de possuir atividade anticarcinogênica (KRASAEKOOPT; WATCHARAPOKA, 2014). Estes microrganismos também apresentam potencial biotecnológico, que despertam interesse da indústria em diferentes ramos (SILVA et al., 2019).

Probióticos são incorporados em uma grande variedade de produtos alimentícios, principalmente em derivados lácteos, como leite, sorvete, iogurte, queijo (GARCÍA-CEJA et al., 2015; KINGWATEE et al., 2015). Sua aplicação também tem crescido em outros tipos de alimentos, como leite de soja (BABASHAHI et al., 2020), maionese (TENEVA et al., 2020), patês, carnes, fórmula infantil (BEREZOVSKAYA et al., 2020), sobremesas (HASGUCMEN; SENGUN et al., 2020), doces (PRAVEEN et al., 2020) e gomas de mascar (SILVA et al., 2021). Entretanto, para que um microrganismo seja considerado probiótico, ele precisa atender a alguns requisitos que visam garantir seus resultados positivos sobre a saúde. Ao mesmo tempo é necessário que ele passe pelo processo digestivo em quantidades iguais ou superiores a 10^7 UFC/g de alimento (FAO/WHO, 2002).

Assim como os probióticos, as fibras prebióticas podem conferir funcionalidade a um alimento. Os prebióticos, por sua vez, são aditivos alimentares não digeríveis que promovem o crescimento de microrganismos benéficos no intestino através de fermentação seletiva, e aumentando sua viabilidade em matrizes alimentares (CUELLO-GARCIA et al., 2017). Essa ação sinérgica entre

probióticos e prebióticos é chamada de simbiose, conforme a primeira descrição científica de De Vrese e Schrezenmeir (2008).

A modificação de hábitos e problemas de saúde tem causado impacto no estilo de alimentação. É cada vez mais crescente o número de pessoas que adotaram o vegetarianismo ou veganismo (BARTHELS et al., 2018). No âmbito de restrições por saúde, há os indivíduos que não consomem lácteos devido à alergia a proteína do leite, níveis elevados de colesterol e intolerância a lactose, aumentando a procura por substitutos vegetais (BAKR, 2015; PANGHAL et al., 2018).

O desenvolvimento de um novo produto funcional proporciona uma oportunidade para contribuir com a melhoria da qualidade dos alimentos e a saúde dos consumidores, tendo em vista sua aplicação na alimentação da população em geral, atuando na promoção da saúde (FARIAS et al., 2019).

Portanto, este trabalho se dedicou a investigar o efeito do prebiótico fruto-oligossacarídeo (FOS) sobre a viabilidade de três diferentes espécies de *Lactobacillus* sp., selecionando a cepa com melhor desempenho para aplicação em suco de abacaxi. Dentre os principais prebióticos, o FOS apresenta menor quantidade de publicações sobre viabilidade de *Lactobacillus* spp. em sucos tropicais. A escolha da utilização de uma bebida não láctea deve-se ao fato de que a quase a totalidade de produtos disponíveis no mercado são produtos à base de leite. A abordagem desta pesquisa, além de introduzir um produto de origem vegetal, visa ampliar a possibilidade de elaboração de um simbiótico também em outras classes de alimentos. A seleção do abacaxi, uma fruta tropical, é baseada na valorização da nossa cultura regional, riqueza nutricional e ampla aceitação por parte dos consumidores.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 ALIMENTOS FUNCIONAIS

O interesse do consumidor por um estilo de vida mais saudável tem levado ao desenvolvimento de alimentos que supram necessidades nutritivas, de saúde e que ao mesmo tempo sejam atrativos, saborosos e com boa aceitação no mercado. Os produtos que oferecem efeitos positivos sobre a saúde ou ingredientes com estas características, alegados ou comprovados, são denominados “alimentos funcionais” (ADRIANA et al., 2017). O termo foi descrito pela primeira vez no Japão, referindo-se a um alimento com ingredientes específicos e satisfação sensorial, nutrição e modulação dos sistemas biológicos (BIGLIARDI; GALATI, 2013).

Apesar de se tratar de um campo de estudo relativamente novo, a crença do alimento como “remédio”, atualmente chamado de “medicalização do alimento” (VIANA et al., 2017) e cura para doenças, remonta a era medieval, onde profissionais de saúde persas escreveram tratados sobre nutrição, saúde e dietas (NIKAEIN; ZARGARAN; MEHDIZADEH, 2012).

No presente século a literatura científica reporta os alimentos funcionais como aliados no tratamento da obesidade (SOUZA et al., 2018), prevenção de doenças cardiovasculares (RYAN et al., 2015), balanço de colesterol plasmático (REIS et al., 2017) e prevenção de câncer (REIS et al., 2014).

Dentre os alimentos funcionais a literatura relata os prebióticos (adicionados de fibras não digestíveis), fortificados (com vitaminas, ômega-3), alterados (removendo componentes nocivos) e os probióticos, que serão explanados a seguir (BIGLIARDI; GALATI, 2013).

2.2 PROBIÓTICOS

Bactérias ácido-láticas e leveduras que exercem efeito positivo sobre a saúde do hospedeiro podem ser denominados probióticos (HILL et al., 2014). Tendo como sítio de ação e fixação o intestino grosso, sua primeira atividade no organismo hospedeiro é restaurar a microbiota (SÁNCHEZ et al., 2016) e promover o crescimento de outros microrganismos benéficos presentes no local (BUTEL, 2014).

Os probióticos são capazes de estimular uma resposta imunológica no seu

hospedeiro, atuando na prevenção e tratamento de doenças infecciosas e inflamatórias (LEE et al., 2014). Possuem propriedades anticarcinogênicas – embora ainda não completamente elucidadas (SO et al., 2017), antialérgicas (LEE et al., 2014), anti-hipertensivas (LOLLO et al., 2015), auxiliam na digestão da lactose através da enzima bacteriana lactase (OAK; JHA, 2018), no combate a microrganismos patogênicos (LI et al., 2018) e outras doenças e como hepatopatias (MA et al., 2013).

Com relação aos mecanismos de ação no intestino, sítio-alvo da colonização dos probióticos, Szymánski et al. (2006) destacam a produção de substâncias antimicrobianas, competição pela adesão na parede intestinal, competição por nutrientes, acidificação do local e aumento da secreção de mucina.

Os lactobacilos são células bacterianas em formato de bastonetes. São gram-positivos, não esporulados, imóveis, anaeróbios ou anaeróbios facultativos (SLOVER; DANZIGER, 2008). Os *Lactobacillus* comumente empregados na indústria alimentícia são compostos de bactérias ácido-láticas. O principal produto metabólico desses microrganismos é o ácido lático, produzido através da fermentação de carboidratos (BURITI; SAAD, 2007). Essas bactérias podem ser encontradas em diferentes nichos ecológicos, tais quais plantas (cereais, frutas e vegetais), silagem, alimentos fermentados e no próprio corpo humano, nas mucosas oral, intestinal e vaginal (PITHVA et al., 2012).

No intestino, os principais produtos da fermentação dessas bactérias ácido-láticas são ácidos graxos de cadeia curta, acetato, propionato, butirato, gases H₂ e CO₂, amônia, aminas e fenóis e energia. Embora sejam absorvidos no intestino, os compostos atuam em diferentes locais do corpo através da corrente sanguínea (MacFARLANE; MacFARLANE, 1997).

Para que o microrganismo possa exercer suas atividades metabólicas e auxiliar na melhoria da saúde, é necessário que o mesmo seja capaz de permanecer ativo no intestino. Para tanto, a célula bacteriana precisa resistir ao ambiente ácido do estômago e às enzimas digestivas (VEMURI et al., 2018). Pithva et al. (2012) adicionaram outros critérios para a seleção de bactérias probióticas, como a origem, que deve ser humana, não patogênica, capacidade adesiva à mucosa intestinal e colonização do trato gastrointestinal produzindo compostos antimicrobianos.

Para produzir um alimento probiótico e, portanto, funcional, é necessário levar em conta algumas questões importantes. Os pontos mais críticos são a concentração do inóculo, as técnicas de processamento, o transporte e a temperatura de armazenamento (PERRICONE et al., 2015). Além disso, é necessário considerar as características do produto, como seu conteúdo de proteína, gorduras, açúcares, aditivos alimentares (espessantes, flavorizantes, estabilizantes etc.), pH, acidez titulável, concentração de oxigênio dissolvido e presença de peróxido de hidrogênio (PERRICONE et al., 2015).

Os principais microrganismos intitulados probióticos pertencem aos gêneros *Lactobacillus*, *Bifidobacterium*, *Streptococcus* e *Lactococcus* (KUMAR; VIJAYENDRA; REDDY, 2015). Destes, porém, as espécies bacterianas aprovadas pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA, 2008) são: *Lactobacillus acidophilus*, *L. casei* variedades *shirota*, *ramnosus* e *defensis*, *L. paracasei*, *Lactococcus lactis*, *Bifidobacterium bifidum*, *B. animalis* (incluindo a subespécie *B. lactis*), *B. longum* e *Enterococcus faecium*.

Os *Lactobacillus* parecem ser mais resistentes a bacteriófagos e produzem mais produtos finais que o gênero *Enterococcus*. Alimentos fermentados, devido ao baixo pH, podem dificultar mais a sobrevivência dos probióticos. Durante a fermentação os lactobacilos apresentam alguns produtos do metabolismo secundário com atividade biológica, como a produção de vitamina B e peptídeos bioativos (STANTON et al., 2005).

Entretanto, mesmo havendo certo consenso referente às alegações funcionais dos *Lactobacillus*, é necessário que a cepa demonstre ao menos *in vitro* tais características. De acordo com Baldassare (2019) as atividades probióticas são cepa-dependentes. Em outras palavras, antes de atribuir o título de “probiótico” é necessário testar a funcionalidade da linhagem.

2.2.1 *Lactobacillus rhamnosus*

L. rhamnosus é uma espécie aceita mundialmente, utilizada na elaboração de produtos probióticos. A literatura relata uma ampla gama de alimentos adicionados deste microrganismo, tais quais iogurtes (KRASAEKOOPT; WATCHARAPOKA, 2014), sucos (SILVA et al., 2014a), maionese (BIGDELIAN et

al., 2014), pães (SILVA et al., 2014a), leite fermentado (PARKER et al., 2018), geleia (CHAWAFAMBIRA et al., 2020), sucos (WHITE et al., 2018) e queijo (AMINE et al., 2014). Em nível clínico costuma ser uma opção no tratamento de diarreia causada por antibioticoterapia (SZAJEWSKA; KOŁODZIEJ, 2015).

L. rhamnosus GG apresenta pili, uma estrutura proteica externa que permite a troca de material genético durante a conjugação (reprodução). O pili, que é formado por proteínas da pilina, permite o deslocamento da bactéria e confere a capacidade de fixação, inclusive no epitélio intestinal. Em estudos observou-se que a atividade aderente ao muco do trato intestinal se deve à presença da proteína SpaC, produzida pela pilina, elucidando o motivo da maior persistência da cepa às células epiteliais do intestino ainda que em longa distância, em relação a outras espécies investigadas (KANKAINEN et al., 2006; REUNANEN et al., 2012).

2.2.2 *Lactobacillus acidophilus*

Lactobacillus acidophilus é alvo antigo de investigações genotípicas e, sobretudo, fenotípicas. É uma bactéria capaz de se reproduzir em ambientes microaerófilos ou mesmo totalmente anaeróbios, em até temperaturas de 41 °C (JAFAREI, 2011).

Geneticamente as cepas de *L. acidophilus* apresentam homologia, indicando uma ancestralidade comum. De forma geral, a espécie é grande produtora de ácido láctico, fermentadora de carboidratos e sensível a cloranfenicol e eritromicina (JOHNSON et al., 1980).

Um estudo verificou que cepas da espécie são capazes de modular funções analgésicas intestinais e assim reduzir desconforto abdominal, ampliando a já larga janela de possibilidades de aplicações de probióticos na saúde (ROUSSEAU et al., 2006).

Em estudo conduzido por Gilliland, Nelson e Maxwell (1985) *L. acidophilus* mostrou crescimento favorável em presença de bile, sobretudo em ambiente anaeróbio. Os pesquisadores correlacionaram ainda a capacidade de assimilação do colesterol pelas cepas estudadas com a redução desses lipídios séricos em cobaias suínas.

Além da redução do colesterol é possível atribuir à espécie a possibilidade

de ação hipoglicemiante (TIDERENCEL et al., 2019), observada em modelos murinos (NIKBAKHT et al., 2016).

A literatura retrata a capacidade antioxidante como sendo uma característica proeminente do *L. acidophilus*, tanto no que diz respeito à proteção de alimentos e sua vida de prateleira, como também em seus efeitos sobre células humanas (HOUGAARD et al., 2016; CHEN et al., 2018; BAGHBANI-ARANI et al., 2019).

Em alimentos, há relato da aplicação desta bactéria em suco (MALIK et al.; WORKU et al., 2019), iogurte (ERTEM et al., 2018), chá (YEE et al., 2019), leite fermentado (ABDOLLAHZADEH et al., 2018), mousse (SANTOS et al., 2019) e chocolate (KONAR et al., 2017).

2.2.3 *Lactobacillus casei*

O grupo *Lactobacillus casei* comporta diferentes subespécies e é o mais estudado das bactérias ácido-láticas. A taxonomia encontra dificuldades de classificação devido às mutações que as cepas sofrem, especialmente pela perda ou ganho de plasmídeos (HILL et al., 2018).

Diferentemente das duas espécies descritas anteriormente, *L. casei* apresenta aerotolerância, que o permite crescer em presença de oxigênio (ASHRAF; SHAH, 2011; SÁNCHEZ et al., 2019). Trata-se de uma espécie amplamente conhecida, inclusive pelo consumidor final, graças à popularização de leites e outros produtos fermentados. Assim como *L. acidophilus*, acredita-se que *L. casei* seja hábil a reduzir a glicose plasmática (NIKBAKHT et al., 2016).

Junto com os diversos produtos alimentícios encontram-se os diversos estudos também e, por consequência, diferentes alegações de propriedades funcionais e benéficas à saúde. *L. casei* é utilizado tanto de forma profilática como de forma terapêutica para as afecções associadas ao desbalanço da microbiota intestinal (HILL et al., 2018).

Contudo, devido à grande variedade de características genéticas dentro de um mesmo grupo, reitera-se a necessidade de estudos que avaliem cepa a cepa, sem generalização, a fim de verificar se os atributos funcionais são de fato encontrados no espécime que está sendo estudado.

Há relatos científicos da aplicação desta bactéria em diferentes alimentos,

como leite fermentado (ABDEL-HAMID et al., 2019), queijo minas (SPERRY et al., 2018), iogurte (BAI et al., 2020), suco (MALIK et al., 2019; OZCAN et al., 2020), sorvete (FARIAS et al., 2019), água de coco fermentada (GIRI et al., 2018) e salame (BIS-SOUZA et al., 2020).

2.3 POTENCIAL BIOTECNOLÓGICO DOS PROBIÓTICOS

As enzimas microbianas têm grande importância biotecnológica, sendo empregadas em diversos segmentos industriais, como têxtil, de papéis, biorremediação, fermentação e produção de ingredientes alimentícios (MAMO; ASSEFA, 2018; SHARMA et al., 2019; SILVA et al., 2019; FAROOQ et al., 2021).

Dentre elas, as enzimas digestivas desempenham funções importantes na degradação de moléculas e absorção de nutrientes. Atualmente a suplementação de enzimas de origem animal é a mais empregada para indivíduos com desordens digestivas (ROXAS, 2008).

Entretanto, enzimas extraídas de vegetais têm ganhado espaço, bem como as produzidas por bactérias e fungos, até mesmo por questões éticas. Estas últimas possuem a vantagem de atuação em uma maior variedade de pH, menor dosagem e um custo inferior (IANIRO et al., 2016).

2.3.1 Amilase

Enzimas amilolíticas tem recebido grande interesse da indústria alimentícia, têxtil, farmacêutica, de papéis, de detergentes e também na produção de açúcar e etanol (NAIDU; SARANRAJ, 2013; FAROOQ et al., 2021). No ramo alimentício, as amilases são importantes na clarificação de sucos, panificação, produção de cerveja e bolos (RANA et al., 2017). Estas enzimas também podem ser aplicadas na área ambiental na degradação de poluentes (RANA et al., 2017).

As amilases são enzimas que costumam ter ótimo desempenho em pH neutro a alcalino. As amilases hidrolisam amido em polímeros que contêm glicose (NAIDU; SARANRAJ, 2013), convertendo-o em ácido láctico (ANILLA et al., 2016).

Essas enzimas são obtidas em larga escala por fungos e bactérias, por meio de fermentação, variando de acordo com a espécie/cepa e condições de incubação, como temperatura, pH e composição do meio. As amilases obtidas de bactérias

são mais baratas e de rápida produção (FAROOQ et al., 2021).

Lactobacillus que produzem amilase são importantes também no sistema gastrointestinal de animais de criação, como coelhos, porcos (PADMAVATHI et al., 2018) e peixes (HASSAAN et al., 2020).

2.3.2 *Protease*

As proteases constituem o grupo de enzimas hidrolíticas mais estudado (SILVA et al., 2019), capaz de hidrolisar proteínas em peptídeos simples e aminoácidos (HAQ; MUKHTAR, 2006). A atividade proteolítica pode ser desejável para promoção de benefícios à saúde (EDALATI et al., 2019), mas também pode ter impacto positivo ao meio ambiente, através da redução de produtos químicos tóxicos em detergentes (SILVA et al., 2019) e na purificação da prata de raios-x (TAVANO et al., 2018). Também é utilizada na indústria de queijos, vinhos, cerveja e na panificação (MAMO; ASSEFA, 2018). Esse grupo é responsável por mais de 60% das vendas de enzimas em todo o mundo (SHARMA et al., 2019).

Proteases são produzidas por uma ampla gama de microrganismos, de forma barata e eficiente (HAQ; MUKHTAR, 2006; SHARMA et al., 2019). Naturalmente os *Lactobacillus* possuem um sistema enzimático (proteases e peptidases) que os permitem quebrar caseína e consumir seus aminoácidos (SALAMA et al., 1995; KUMARI; BHALLA, 2016).

As proteases podem ser estudadas para desenvolvimento de alimentos funcionais, podendo ser destinadas às pesquisas de hidrólise de proteínas alergênicas, como as do leite (GUADIX et al., 2006), da soja (YING et al., 2021), de camarões, amendoim, ovo e trigo (TAVANO et al., 2018).

Na indústria de alimentos, as proteases podem produzir hidrolisado proteico de alto valor nutricional, a partir de soja, resíduo de peixe e soro de leite. Além da aplicação nutricional, alguns hidrolisados de proteínas são utilizados como espessantes, aromatizantes e branqueadores de café (SHARMA et al., 2019).

Outra interessante aplicação biotecnológica é a liberação de peptídeos bioativos, com ações antimicrobianas, antioxidantes, anti-hipertensivas, antitrombóticas e hepatoprotetoras (TAVANO et al., 2018).

2.3.3 Celulase

A celulose é um polímero estrutural presente abundantemente em vegetais. O ser humano não possui em seu complexo enzimático digestivo nenhuma enzima capaz de quebrar as moléculas de celulose (DHINGRA et al., 2012).

A celulase é capaz de hidrolisar as ligações glicosídicas β -1,4 da cadeia de celulose, que fornece proteção osmótica e resistência mecânica às células vegetais. O grupo das celulasas consiste em três tipos de enzimas: endoglucanase, exoglucanase e β -glucosidase (SILVA et al., 2019).

A aplicação industrial das celulasas compreende as indústrias de produção e reciclagem de papel, decomposição de resíduos do solo, produção de etanol. No ramo da tecnologia de alimentos, as celulasas são empregadas na elaboração de espessantes, na clarificação de sucos (SIQUEIRA et al., 2020), extração de fibras dietéticas (SONG et al., 2018; LIU et al., 2021), extração de compostos bioativos, controle de amargor em bebidas cítricas e na panificação (KUHAD et al., 2011).

A maior parte dos microrganismos produtores de enzimas celulolíticas é residente do rúmen de animais ruminantes. Alguns actinomicetos encontrados no solo também são descritos como capazes de hidrolisar a celulose, seguidos de bactérias termófilas, psicrófilas e acidófilas. Dentre os acidófilos, o gênero *Bacillus* merece destaque (THAPA et al., 2020).

2.3.4 Lipase

As lipase consistem numa classe de hidrolases que catalisam a hidrólise de triglicerídeos e ácidos graxos livres por meio da interação óleo- água. Além disso, essas enzimas catalisam a hidrólise e transesterificação de outros ésteres e são bastante utilizadas em biotecnologia e na indústria (SILVA et al., 2019).

Os microrganismos produtores de lipases ganharam a preferência da indústria, devido à produção de enzimas com estabilidade, simplicidade na manipulação genética, alta rentabilidade, suprimento regular seletividade e especificidade do substrato. Bactérias, fungos e leveduras são descritos como produtores, com destaque ao gênero *Bacillus* (BHARATHI; RAJALAKSHMI, 2019).

As lipases são apreciadas na produção de queijo, uma vez que elas aceleram a lipólise de manteiga e a maturação e intensificam seu sabor, graças aos ácidos graxos livres. Graças às reações hidrolíticas é possível alterar cadeias de ácidos graxos, produzindo óleos e gorduras de valor mais alto. Além das aplicações em alimentos, as lipases também são desejáveis na cosmetologia, farmacologia e em diagnósticos médicos (CHANDRA; SINGH; ARORA, 2020).

2.3.5 Inulinase

Depois do amido, a inulina é o polissacarídeo não estrutural (polifrutano) mais abundante encontrado em plantas. Podemos encontrar em grandes quantidades em alcachofra, alho, alho-poró, chicória, centeio, cevada e aspargos (SINGH; SINGH, 2017; DAS et al., 2019).

A enzima inulinase tem por função a hidrólise de inulina em frutose ou fruto-oligossacarídeos, dois produtos de elevado interesse industrial e nutricional. As inulinases podem ser aplicadas para produção de ácido cítrico, ácido láctico, bioetanol, frutose e xarope de ultra-alta frutose (DAS; BHAT; SELVARAJ, 2019).

De acordo com Singh e Singh (2017), os gêneros microbianos com destaques na produção dessa enzima são *Aspergillus* spp., *Penicillium* spp., *Kluyveromyces* spp., *Candida* spp. e *Bacillus* spp. A vantagem da produção microbiana é a facilidade na manipulação genética, no cultivo e no manuseio (SINGH, CHAUHAN; KENNEDY, 2017).

2.4 PREBIÓTICOS: FRUTO-OLIGOSSACARÍDEOS

Os carboidratos da dieta que se evadem da digestão no intestino delgado sofrem fermentação bacteriana no cólon. A fermentação interfere na microbiota presente no trato gastrointestinal e influencia na função do intestino. Essa atividade intestinal é representada, sobretudo na redução do tempo do trânsito intestinal, graças à capacidade dessas moléculas de aumentar a retenção de água e assim promover a gelificação das fezes (NUNES; GARRIDO, 2018).

Para que um ingrediente seja considerado prebiótico e possa desempenhar

alguma atividade biológica é necessário que este não seja digerível na parte superior do TGI, nem mesmo absorvido pelo intestino delgado. A outra característica básica que o composto deve ter é ser um substrato seletivo para alguma bactéria, de forma que a estimule no crescimento (ROBERFROID et al., 2010; PANDEY; NAIK; VANDIL, 2012).

A maioria dos prebióticos são oligossacarídeos, como fruto-oligossacarídeo, inulina, xilooligossacarídeo, galactooligossacarídeo e isomaltooligossacarídeo. A grande importância na saúde que o prebiótico possui se deve, sobretudo, à sua ação como substrato de fermentação bacteriana, em especial de lactobacilos e bifidobactérias (BLAUT, 2002).

No ambiente anaeróbio do cólon, os substratos são hidrolisados a ácidos graxos de cadeia curta, acetato, butirato, propionato e gases, produzindo energia (CUMMINGS et al., 1987). Ashalou (2020) destaca ainda que os prebióticos são capazes de atuar como imunomoduladores e dificultar a proliferação de microrganismos patógenos. Estudos clínicos têm destacado o sucesso na redução do tempo de tratamento de diarreias com o emprego de prebióticos e simbióticos (NATH et al., 2018; KAMBALE et al.; VASSILOPOULOU et al., 2021).

Apesar de os mecanismos ainda não estarem completamente elucidados, são atribuídos aos prebióticos: redução do tempo de trânsito intestinal, aumento da absorção mineral e redução da chance de desenvolvimento de doenças crônicas não transmissíveis (DOMINGUEZ et al., 2014).

Os prebióticos são seguros, atóxicos e não despertaram intolerância nos consumidores (AL-SHERAJI et al., 2013). O seu efeito é definido como uma “estimulação seletiva do crescimento e/ou atividade(s) de um ou um número limitado de gênero/espécie microbiana na microbiota intestinal que confere benefícios à saúde do hospedeiro” (ROBERFROID et al., 2010).

Os fruto-oligossacarídeos (FOS) são oligômeros de frutose, sendo produzido sinteticamente da sacarose ou através de plantas. Mais especificamente FOS é um termo genérico para oligossacarídeos com ligações glicosídicas do tipo beta ($2 \rightarrow 1$ ou $2 \rightarrow 6$) frutossil-frutose (CHEN; LI; CHEN, 2018). Esses oligossacarídeos apresentam baixo grau de doçura e praticamente não possuem calorias (DOMINGUEZ et al., 2014).

Os FOS, enquanto carboidratos, servem às plantas como reserva energética (DOMINGUEZ et al., 2014; CHEN; LI; CHEN, 2018). Pequenas quantidades são encontradas na natureza, através de vegetais, como chicória, bardana e cebola.

FOS é reconhecido como prebiótico por não se hidrolisar no intestino delgado, graças a suas ligações glicosídicas beta (2→1) frutossil-frutose. Essa característica lhe classificou como oligossacarídeo não digerível, que o torna um substrato à microbiota do cólon (CHEN; LI; CHEN, 2018).

O principal substrato para a multiplicação da microbiota residente no intestino grosso é justamente carboidratos não digeríveis provenientes da alimentação. O FOS resiste às enzimas hidrolíticas contidas nas porções superiores do intestino e fermenta no cólon (CHEN; LI; CHEN, 2018).

Os benefícios à saúde promovidos pelos FOS incluem: estimular o crescimento de bactérias benéficas autóctones do cólon (BOUHNİK et al., 2007; SIVIERI et al., 2014; DELGADO; TAMASHIRO, 2018), reduzir eventos metabólicos atrelados à obesidade (DELGADO; TAMASHIRO, 2018; NUNES; GARRIDO, 2018), promover sensação de saciedade (PERDERSEN et al., 2013; DAUD et al., 2014), reduzir o risco de inflamações e de câncer colorretal (PURAMA et al., 2018), diminuir a população de microrganismos nocivos à saúde intestinal (OKU; NAKAMURA, 2017; DELGADO; TAMASHIRO, 2018), aumentar a absorção de minerais (HOOSHMAND et al., 2010; LOBO et al., 2014; CHRISTIDES; GANIS; SHARP, 2018) e melhorar a resposta imune de forma geral (SHOKRYAZDAN et al., 2016; PURAMA et al., 2018; STEFANIAK et al., 2019).

Ainda não existem estudos suficientes que elucidem completamente a origem, as dosagens diárias necessárias e os mecanismos de fermentação dos FOS (PANDEY; NAIK; VANDIL, 2012).

2.5 SIMBIÓTICOS

A interação sinérgica entre probióticos e prebióticos denomina-se simbiose (DE VRESE; SCHREZENMEIR, 2008). Para que um produto seja considerado simbiótico é preciso que haja comprovação de que o composto prebiótico interaja positivamente com a cepa microbiana incorporada ao alimento.

A relação entre o efeito potencializador, por parte de prebióticos, sobre a

viabilidade de probióticos inicia-se na amamentação. Na composição do leite materno encontra-se uma gama de oligossacarídeos. A grande população microbiana encontrada e identificada nas fezes de recém-nascidos saudáveis, alimentados exclusivamente com leite materno, é composta de *Bifidobacterium* sp., que é um gênero que compreende diversas espécies probióticas. Esses bebês apresentam menos problemas de caráter intestinal e respiratório (AL-SHERAJI et al., 2013). Assim sendo, estabeleceu-se uma conexão entre essas bactérias com características benéficas a seus hospedeiros e o consumo dessas fibras não digeríveis.

Por possuírem uma estrutura química relativamente complexa, os prebióticos constituem um grupo de carboidratos que não são digeríveis por todo tipo de bactérias. Portanto, é acertado dizer que eles possuem uma ação “seletiva” no crescimento de microrganismos. Apenas poucos, considerando os milhões de espécies existentes na natureza, são capazes de fermentá-los (AL-SHERAJI et al., 2013).

A associação de prebióticos e probióticos é mais eficiente na modulação da microbiota intestinal, quando comparado aos seus usos isolados. Em um levantamento realizado por Vallianou et al (2020), determinados simbióticos têm a habilidade de regular o apetite e exercer efeitos anti-obesidade, incluindo potencial perda de peso.

Composições simbióticas aparentam ser vantajosas ao sistema imunológico. Há relatos da redução de proteína C reativa (ASKARI et al., 2016), inflamações intestinais (PLAZA-DÍAZ et al., 2008) e supressão de tumores e atividades antineoplásicas (GREENHALGH et al.; THILAKARATHNA; LANGILLE; RUPASINGHE, 2018; VAFA et al.; NAVAEI et al., 2020). Nunpan, Suwannachart e Wayakanon (2019) indicam que os simbióticos podem atuar na supressão de microrganismos patógenos.

Contudo, reitera-se que o termo “simbiótico” seja reservado apenas para o verdadeiro sinergismo entre a cepa e a fibra, onde haja o real favorecimento do microrganismo na sua implantação e sobrevivência, especialmente no intestino (DE VRESE; SCHREZENMEIR, 2008).

2.6 ABACAXI

O abacaxi (*Ananas comosus* (L.)) é um fruto cujas variantes têm sido exaustivamente estudadas quanto às suas propriedades. É a única espécie da família *Bromeliaceae* consumida comercialmente. Sua produção mundial é de cerca de 13 milhões de toneladas, sendo considerado um fruto de alto valor econômico, principalmente na Tailândia, Costa Rica, Brasil e Filipinas. O fruto apresenta aroma e doçura atrativos, além de vitaminas e dos compostos bioativos, como compostos fenólicos e antocianinas (LOBO; PAULL, 2017; HALIM et al., 2018).

Devido a suas características organolépticas bem apreciadas, o abacaxi é um produto desejado mundo afora, marcado por sua suculência e sabor. Considerado como não-climatérico, o fruto é originário da América Latina e acabou se espalhando mundo afora com a colonização europeia da região. Tornou-se um símbolo das regiões tropicais, especialmente no Brasil (LOBO; PAULL, 2017; ROCHA; SOUZA; SILVA, 2019).

No cenário nacional, a Paraíba destaca-se como o segundo maior produtor de abacaxis, sendo o estado do Pará o responsável pela maior safra do fruto. Dados da EMBRAPA contabilizam uma produção de 334.880 frutos em 2018. Seguindo o Norte, a região Nordeste é a segunda maior região produtora do país, com Pernambuco postando-se na sexta colocação, com uma produção de 29.236 naquele ano (EMBRAPA, 2019). A fruta possui abundante oferta entre os meses de outubro e janeiro, o que facilitará na escolha e favorecerá o custo (CEASA, 2020).

Em países em desenvolvimento, o consumo típico do abacaxi é em sua forma *in natura*. Já em países desenvolvidos, costuma-se observar o fruto processado, em forma enlatada, desidratada ou como suco (LOBO; PAULL, 2017).

O produto do abacaxizeiro é empregado na medicina popular em diversos países, abrindo margem para pesquisas que buscam comprovar sua eficácia. Sua polpa, cascas e até mesmo suas folhas são objetos de estudo de efeito analgésico (GOLEZAR, 2016), antioxidante (SAPTARINI et al., 2019), anticarcinogênico (LEE et al., 2019), anti-inflamatório (LEE et al., 2018), antidepressivo (KAFEEL, 2016), antimicrobiano (MAVANI et al., 2020), preventivo de obesidade (AÏKPE et al., 2020),

antiplasmodial (TORDZAGLA, 2018), cicatrizante (GOLEZAR, 2016), anti-helmíntico (SWARGIARY et al., 2020), antirreumático (KARGUTKAR; BRIJESH, 2016), antiproliferativo (CHINEDU et al., 2016) e hipocolesterolêmico (MAJEED et al., 2019). No Brasil relata-se a aplicação em xaropes, antitussígenos e expectorantes, sendo utilizado também no auxílio ao tratamento de inflamações, infecções, doenças do estômago e diabetes (LOPES NETO et al., 2015; PEIXOTO et al., 2016).

De acordo com Hossain et al. (2015), o abacaxi possui alto valor nutricional. O fruto detém elevada umidade, facilmente perceptível em sua suculência. Dos sólidos totais, mais de 80% corresponde a carboidratos. Possui ainda fibras e ácidos orgânicos, como o ácido cítrico, enquanto que seu conteúdo calórico é de apenas 52 calorias (em 100 g). O abacaxi é fonte de vitaminas e alguns minerais (cálcio, potássio, fósforo).

Devido à alta perecibilidade inerente dos produtos naturais, devido à sua grande atividade de água e umidade, o fruto maduro do abacaxi não pode ser transportado por um longo período de tempo. Ao mesmo tempo, colher antes do grau de maturação adequado impactará na qualidade do produto – seu sabor, aroma, acidez e doçura (LOBO; PAULL, 2017). A utilização do abacaxi como ingrediente é uma boa forma de redução de perdas e desperdício de alimentos, que torna mais relevante esta pesquisa.

2.7 PRODUTOS TROPICAIS FUNCIONAIS: VIABILIDADE

O Brasil destaca-se como um dos maiores produtores de frutas em todo o mundo, sobretudo das frutas tropicais. O país é responsável pela produção de 40,5 milhões de toneladas, figurando atrás apenas da China e da Índia (EMBRAPA, 2019; PELAIS et al., 2020).

Muitas pesquisas têm explorado o potencial funcional de frutos tropicais para desenvolvimento de novos alimentos, com ênfase na pesquisa de compostos bioativos, como flavonóis, carotenoides, compostos fenólicos e ácidos graxos (WURLITZER et al., 2019; KUMORO et al.; VIANA et al.; YASSIN et al., 2020; BENVENUTTI et al., 2021).

Podemos encontrar na literatura estudos dedicados à produção de bebidas

de origem vegetal como carreadoras de células probióticas. Desde o início dos anos 2000 há registro de sucos de cereja, melão, lichia, laranja, tomate, inhame além de blends e smoothies contendo mais de uma fruta ou vegetal (YOON et al., 2004; ROGERS, 2008; NUALKAEKUL et al., 2012; ZHENG et al., 2014; FONTELES et al. ; LEE et al., 2011; RICCI et al., 2019).

O mercado global de bebidas probióticas não lácteas foi de aproximadamente 50 milhões de dólares, concentrando-se majoritariamente na Europa (ASPRI; PAPADEMAS; TSALTAS, 2020). Este número expressivo se dá pelo crescimento da demanda por alimentos que não sejam de origem animal. No Brasil 30 milhões de pessoas se consideram vegetarianas ou veganas, indicando um novo nicho comercial a ser explorado (PIMENTEL et al., 2020).

Devido à sua curta vida de prateleira e aos altos valores de desperdício pós-colheita, o desenvolvimento de produtos probióticos à base de frutos tropicais desponta como uma alternativa financeira ao setor. Por outro lado, o mercado de alimentos funcionais encontra nas frutas tropicais um veículo com diferentes vantagens, entre elas a baixa alergenicidade, ausência de colesterol, baixo custo e um substrato de simples manipulação (PANGHAL et al., 2018).

A própria composição das frutas tropicais pode favorecer a manutenção dos probióticos em um suco, pois o açúcar, o alto valor nutricional e vitaminas podem atuar como protetores no baixo pH estomacal (ASPRI; PAPADEMAS; TSALTAS, 2020).

Um suco pode se tornar probiótico através da adição das células probióticas diretamente na bebida, bem como por meio de fermentação. Neste caso, o microrganismo é aplicado para se multiplicar dentro do suco e detém a vantagem de apresentar maior viabilidade comercial. Contudo, este processo leva ao consumo dos açúcares presentes na formulação e, como parte de seu metabolismo, a produção de ácidos orgânicos e compostos que podem gerar *off-flavors*, que podem causar rejeição do produto (PEREIRA; RODRIGUES, 2018).

Embora muitos estudos demonstrem viabilidade satisfatória dos probióticos em determinados sucos, também há relatos de acentuado declínio na viabilidade destes microrganismos durante a vida de prateleira e no processo de digestão simulado *in vitro* (DE PRISCO et al., 2015; RANADHEERA et al., 2020).

Os frutos tropicais costumam apresentar considerável acidez, que se torna um desafio na manutenção do número adequado de microrganismos em um suco. Todavia, conforme relata a literatura, algumas cepas de *Lactobacillus* são resistentes ao baixo pH, tornando viável empregá-las (PEREIRA; RODRIGUES, 2018).

De acordo com Aspri, Papademas e Tsaltas (2020), fibras prebióticas podem ser adicionadas aos produtos com o propósito de proteger as células probióticas, tanto durante sua vida de prateleira como em passagem pelo sistema gastrointestinal.

A limitada informação a respeito de bebidas funcionais à base de frutos tropicais, composta de fibra e bactérias com potencial probiótico, bem como a necessidade de explorar as características das cepas, torna esta pesquisa relevante.

3 HIPÓTESE

Espécies de lactobacilos classificados como probióticos possuem viabilidade aumentada pela ação de frutooligossacarídeos para aplicação em suco de abacaxi como matriz alimentar.

4 OBJETIVOS

4.1 OBJETIVO GERAL

Investigar a viabilidade de *L. rhamnosus*, *L. casei* e *L. acidophilus* na presença de fruto-oligossacarídeo para a elaboração de suco de abacaxi (*Ananas cosmosus* L.) com potencial simbiótico.

4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar a atividade antimicrobiana e antioxidante do *L. rhamnosus* GG ATCC 53103, *L. casei* ATCC 334 e *L. acidophilus* ATCC 4356;
- Verificar a produção de enzimas com potencial biotecnológico;
- Investigar o perfil das cepas à suscetibilidade a antimicrobianos;
- Determinar a sobrevivência do *L. rhamnosus* GG ATCC 53103, *L. casei* ATCC 334 e *L. acidophilus* ATCC 4356, com e sem prebiótico, durante simulação das condições gastrointestinais *in vitro*;
- Produzir e caracterizar o suco de abacaxi com potencial simbiótico;
- Avaliar a vida de prateleira do produto, bem como a viabilidade da bactéria inoculada e a sobrevivência à digestão *in vitro*.

5 MÉTODOS

5.1 LOCAL E PERÍODO DO ESTUDO

O presente estudo foi realizado no Laboratório de Experimentação e Análise de Alimentos (LEAAL, Departamento de Nutrição, UFPE), Laboratório de Química de Produtos Naturais e no Laboratório de Microbiologia Aplicada (LAMAp, Departamento de Medicina Tropical, UFPE), compreendendo o período de novembro de 2017 a abril de 2021.

5.2 CULTURA DE *Lactobacillus* spp.

As linhagens utilizadas foram *Lactobacillus rhamnosus* GG ATCC 53103, *L. acidophilus* ATCC 4356 e *L. casei* ATCC 334.

A cepa de *L. rhamnosus* GG ATCC 53103 foi obtida comercialmente na forma liofilizada (Roval®). As demais espécies (*L. casei* ATCC 334 e *L. acidophilus* ATCC 4356) foram concedidas pelo cepário do Laboratório de Microbiologia do LEAAL da UFPE, em forma de cultura estoque.

As cepas criopreservadas de *L. rhamnosus*, *acidophilus* e *casei* foram inoculadas em meio Man, Rogosa e Sharpe (MRS, Merck®) caldo e incubadas em estufa à temperatura de 37 °C/24 h em anaerobiose (Tecnal® TE-391). Após as 24 h, 1 ml foi repicado novamente para um tubo com 10 ml de MRS. Este procedimento de “ativação” das cepas foi realizado antes de cada etapa analítica posteriormente descrita.

Para uso posterior e a fim de manter todas as espécies nas mesmas condições de armazenamento, o *L. rhamnosus* liofilizado foi estocado a -18 °C em MRS e glicerol (1:1).

Para contagem ou isolamento das colônias empregou-se o meio ágar MRS (Acumedia®) com incubação a 37 °C/48 h, por meio de semeio em superfície ou em profundidade, de acordo com a necessidade de cada análise.

5.3 CONTAGEM DE CÉLULAS VIÁVEIS

O número de células viáveis foi determinado através da contagem de unidades formadoras de colônia. Para tal foram realizadas diluições decimais seriadas em solução salina 0,9% estéril. A inoculação foi baseada no método de *pour-plate* (SILVA et al., 2007), onde 1 mL da diluição foi depositado em uma placa de Petri, recebendo ágar MRS, seguido de homogeneização. As placas foram incubadas conforme as condições descritas no item 5.2.

5.4 IDENTIFICAÇÃO GENÉTICA DAS CEPAS

Para a extração do DNA genômico da cepa obtida comercialmente utilizou-se o DNeasy Blood & Tissue Kit (Quiagen), seguindo as recomendações do fabricante, a partir de 1500 µL de cultura crescida em caldo MRS (Merck) a 37 °C/24 h. O DNA extraído foi quantificado em NanoDrop 2000c (Thermo Fisher Scientific Inc.).

As reações de amplificação de DNA ocorreram através da Reação em cadeia da polimerase (PCR). Utilizou-se 40-100 ng do DNA-alvo, 200 mM de cada dNTP, Tris-HCl 50mM (pH 9,0), NaCl 50 mM, MgCl₂ 5 mM e 1U de Taq DNA polimerase (Promega). A amostra foi submetida à termociclagem em GeneAmp PCR System 9700 (Applied Biosystems). Os produtos obtidos da PCR foram analisados em eletroforese em gel de agarose 1% (m/v) diluída em tampão 0,5x TBE (Tris-base 89 mM; ácido bórico 89 mM e EDTA 2 mM pH 8,0) e contendo 0,1 µL/mL SYBR Safe DNA Gel Stain (Invitrogen), a 120 Volts e 150 mA durante 45 minutos, sendo posteriormente visualizados e fotografados sob luz ultravioleta em aparelho de fotodocumentação L-Pix EX (Loccus Biotecnologia).

Os produtos de PCR foram purificados com o kit ExoSAP-IT PCR Product Cleanup (Affymetrix) e quantificados em NanoDrop 2000c (Thermo Fisher Scientific Inc.) para submeter o DNA ao sequenciamento. As reações foram submetidas à termociclagem com desnaturação inicial de 5 min (95 °C). As condições de sequenciamento foram as seguintes:

- 30 ciclos de: desnaturação (45 s/95 °C), anelamento (45 s/55 °C), extensão (90 s/72 °C).

Os cromatogramas foram analisados (Chromas Lite 2.1.1, Technelysium e

os contigs montados com o software BioEdit Sequence Alignment Editor (Tom Hall). As sequências gênicas foram comparadas com as disponíveis de forma online no GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>), através do Basic Local Alignment Search Tool (BLAST).

A identificação genética foi conduzida para a espécie *L. rhamnosus*. As demais espécies já haviam sido previamente catalogadas no cepário da UFPE.

5.5 VIABILIDADE CELULAR NA PRESENÇA DE FRUTO-OLIGOSSACARÍDEO

Um ensaio de viabilidade foi conduzido na presença de três diferentes concentrações de fruto-oligossacarídeos: 1%, 1,5% e 2%. O propósito desse experimento é determinar se o FOS é capaz de promover um aumento nas contagens celulares.

As cepas foram incubadas previamente de acordo com 5.2. O FOS foi obtido comercialmente (Roval®).

Para o teste, o caldo MRS foi preparado seguindo as instruções do fabricante e adicionado do FOS, nas três diferentes concentrações, com posterior esterilização em autoclave. Os tubos foram incubados nas condições do tópico 5.2, bem como a contabilização celular do 5.3.

5.6 ATIVIDADE ANTIMICROBIANA

5.6.1 Teste de difusão em ágar

O ensaio foi baseado no estudo de Tejero-Sariñena et al. (2012), em que cada cepa foi inoculada em caldo MRS conforme descrição do item 5.2. Dessa cultura foi retirado 1 mL para ser repicado em 100 ml de caldo MRS estéril, seguindo-se à incubação anaeróbica a 37 °C/24 h. Durante a fase estacionária do crescimento microbiano, a cultura foi centrifugada (3600 rpm/15 min) para obtenção do sobrenadante livre de células (SLC).

O *pellet* celular foi descartado e metade do volume foi ajustado para pH 7,0 através da adição de NaOH 4 M. Dessa forma é possível verificar se a ação antagonista é relacionada ao pH. O SLC restante foi utilizado nas condições resultantes da fermentação microbiana. O SLC foi filtrado em membrana de 0,22

µm (Millipore, Bedford, Massachusetts), a fim de garantir a remoção das células bacterianas.

Como adaptação do método à realidade do laboratório, as cepas de patógenos alimentares foram repicadas separadamente em ágar Mueller-Hinton (Difco®) a 37 °C/18h. As colônias obtidas foram suspensas em solução de NaCl 0,9% e submetidas à espectrofotometria até atingirem 0,5 na escala de MacFarland. Em seguida, as suspensões foram semeadas por atapetamento em ágar Muller-Hinton. Com auxílio de ponteiros estéreis, poços de 6 mm foram perfurados. Em cada poço adicionou-se 60 µL do SLC, em triplicata, para cada espécie.

As placas foram acondicionadas a 37 °C/18h em atmosfera de 5% de CO₂. As leituras foram feitas através de medição dos halos sem crescimento microbiano ao redor dos poços, com resultados expressos em milímetros.

Cada análise foi realizada em triplicata.

5.6.2 Microdiluição do líquido metabólico em placa de 96 poços

Após o período de 24 h de incubação a 37 °C, um tubo inoculado com cada espécie bacteriana foi centrifugado (3600 rpm/15 min) a fim de separar o sobrenadante, também chamado líquido metabólico (SLC, “sobrenadante livre de células”). Assim como na etapa anterior o líquido metabólico foi aspirado em seringa estéril e filtrado com filtro de seringa 0,22 µm.

Da mesma forma que no ponto 5.3.1, dividiu-se o SLC em duas porções. A primeira fração teve o seu pH neutralizado para 6,8-7,0, para evitar que o pH ácido, naturalmente obtido pelo metabolismo bacteriano, interferisse nas leituras de resultados. A segunda amostra foi utilizada sem passar por nenhum tipo de processo.

Foi utilizado o método de concentração inibitória mínima (CIM), baseado em Songisepp et al. (2005), por diluição em microplaca de 96 poços, cujo objetivo é detectar qual a menor concentração de produto necessário para a inibição do crescimento dos microrganismos patógenos. O presente estudo utilizou *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes* e *Salmonella typhimurium*. Estas cepas foram suspensas em NaCl 0,9% até a concentração de

10^8 - 10^9 , aferidas por densidade óptica.

Como forma de adaptação do ensaio, cada poço recebeu 10 µL da suspensão de cada espécie de patógeno alimentar, 40 µL de caldo BHI (Himedia®) e 50 µL do SLC, com pH modificado ou não. O líquido metabólico foi inoculado em diferentes proporções de diluições.

A leitura ocorreu ao passar 18 h a 24 h, através da aplicação da resazurina, que reduz e muda de coloração de azul para azul/púrpura, indicando a formação de cristais insolúveis de formazan.

O teste foi realizado três vezes em duplicata.

5.6.3 Atividade antagônica por co-incubação

Os *Lactobacillus* spp. foram semeados em ágar MRS a 37 °C/48 h. Os patógenos foram isolados em ágar BHI (Kasvi®) e suspensos em solução de peptona 0,1% (Kasvi®) durante 18 h a 37 °C. A turbidez foi ajustada em espectrofotômetro para 10^9 UFC/ml.

Alíquotas iguais de suspensão de cada espécie de lactobacilo e das cepas avaliadas foram co-incubadas em salina 0.9%, 37 °C/24 h em anaerobiose, conferindo se a turbidez correspondia a aproximadamente 10^9 UFC/ml. Como controle utilizou-se a suspensão contendo apenas os microrganismos testados (HÜTT et al., 2006).

O objetivo do teste de co-incubação é verificar se o potencial probiótico tem capacidade de inibir total ou parcialmente o crescimento das células patogênicas. A quantificação foi realizada em ágar BHI. O valor é subtraído pela contagem do controle, verificando se houve ou não inibição por parte do lactobacilo.

Os valores de inibição são definidos em alto (redução de 5,9-6,5 UFC/ml), intermediário (3,4-5,8) e baixo (0,6-3,2).

Os testes foram realizados com as bactérias apenas e também na presença de FOS, nas três concentrações determinadas.

5.7 SCREENING DE ENZIMAS DE POTENCIAL BIOTECNOLÓGICO

A determinação da atividade enzimática de potencial biotecnológico foi do

tipo qualitativa, a qual foi realizada em duplicata em placas de Petri com meios de cultura sólidos (ágar). Cada meio continha um substrato indutor como fonte de carbono, sendo: amido para detecção de amilase, carboximetilcelulose (CMC) para celulase, gelatina para protease, azeite de oliva e Tween® 20 para lipase e inulina para inulinase.

Cada microrganismo foi inoculado em estria única. As placas foram incubadas a 37 °C por 48 h horas em estufa sob anaerobiose. O resultado foi considerado positivo (microrganismo produtor da enzima) quando houve formação de halo ao redor da colônia, revelado por meio de soluções reveladoras ou não. Abaixo encontra-se a composição de cada meio utilizado.

Os testes foram realizados em duplicata. Cada microrganismo foi testado em pH ácido e em pH alcalino.

5.7.1 Detecção de amilase

A composição do meio de cultura elaborado para determinar a produção de amilase está descrita no Quadro 2 (DE VERAS, 2018). Os dois pH utilizados foram 5,16 e 8,53.

Quadro 2 – Composição do meio para detecção de amilase.

Componente	Quantidade (g/L)
Amido de milho	1,0
NaNO ₃	0,5
K ₂ HPO ₄	1,0
MgSO ₄ · (7 H ₂ O)	0,5
FeSO ₄ · (7 H ₂ O)	0,001
Ágar	15,0
Revelador	Concentração
KI	0,2 g/L

Fonte: Elaboração própria.

5.7.2 Detecção de protease

A detecção da enzima proteolítica seguiu o protocolo de De Veras (2018). No Quadro 3 consta a composição do meio sólido utilizado. Os dois pH utilizados foram 5,16 e 8,55.

Quadro 3 – Composição do meio para detecção de protease.

Componente	Quantidade (g/L)
Gelatina	20,0
K ₂ HPO ₄	0,5
MgSO ₄ · (7 H ₂ O)	0,25
FeSO ₄ · (7 H ₂ O)	0,001
CaCl ₂	0,16
Ágar	15,0
Revelador	Concentração
HgCl ₂	12 g
HCl ₂	16 ml
H ₂ O destilada	80 ml

Fonte: Elaboração própria.

5.7.3 DETECÇÃO DE CELULASE

Para a detecção de celulase utilizou-se carboximetilcelulose como fonte de carbono para o microrganismo. O método foi baseado em De Veras (2018) com modificações. Os dois pH utilizados foram 5,13 e 8,5.

Quadro 4 – Composição do meio para detecção de celulase.

Componente	Quantidade (g/L)
Carboximetilcelulose (CMC)	1,0
NaNO ₃	0,5
K ₂ HPO ₄	1,0
MgSO ₄ · (7 H ₂ O)	0,5
FeSO ₄ · (7 H ₂ O)	0,001
Ágar	15,0
Revelador	Concentração
Vermelho congo	1%

5.7.4 Detecção de lipase

O primeiro método utilizado foi o de emprego do azeite de oliva como fonte de carbono (SILVA et al., 2019). A composição do meio de cultivo está elencada no Quadro 5. Para ambos os métodos, os dois pH utilizados foram 5,0 e 8,53.

Quadro 5 – Composição do meio para detecção de lipase com azeite.

Componente	Quantidade (g/L)
Azeite de oliva extra virgem	0,001
NaNO ₃	0,5
K ₂ HPO ₄	1,0
MgSO ₄ · (7 H ₂ O)	0,5
FeSO ₄ · (7 H ₂ O)	0,001
Ágar	15,0
Revelador	Concentração
Não possui	Não se aplica

Fonte: Elaboração própria.

O segundo método utilizado para a detecção da enzima lipase foi adaptado de Haba et al. (2000). O Tween foi empregado, conforme o Quadro 6.

Quadro 6 – Composição do meio para detecção de lipase com Tween.

Componente	Quantidade (g/L)
Tween® 20	1,0
NaNO ₃	0,5
K ₂ HPO ₄	1,0
MgSO ₄ · (7 H ₂ O)	0,5
FeSO ₄ · (7 H ₂ O)	0,001
Ágar	15,0
Revelador	Concentração
Não possui	Não se aplica

Fonte: Elaboração própria.

5.7.5 Detecção de inulinase

A composição do meio de cultura para detecção da enzima inulinase encontra-se abaixo (Quadro 7).

Quadro 7 – Composição do meio para detecção de inulinase.

Componente	Quantidade (g/L)
Inulina	1,0
NaNO ₃	0,5
K ₂ HPO ₄	1,0
MgSO ₄ · (7 H ₂ O)	0,5
Ágar	15,0
Revelador	Concentração
HCl	5 N

Fonte: Elaboração própria.

5.8 TESTE DE SUSCETIBILIDADE A ANTIBIÓTICOS

Foi utilizado um painel de seis agentes antimicrobianos indicados para bactérias gram-positivas. Os antibióticos (Probac®, Laborclin®, DME®, Sensifar®) empregados foram: vancomicina, penicilina G, ampicilina, gentamicina, eritromicina e tetraciclina.

O método baseou-se no guia “Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing” do Clinical and Laboratory Standards Institute (2016), cuja técnica é de difusão em ágar.

Cada bactéria foi repicada em ágar MRS e incubada em atmosfera de 5% CO₂ a 37 °C/48 h. Após crescimento, as colônias foram coletadas com auxílio de alça bacteriológica e diluídas em NaCl 0,9% estéril, de forma a atingir 0,5 na escala de McFarland, correspondendo a $1,5 \times 10^8$ (1,5 bilhões de bactérias por mL). Em seguida, o inóculo foi semeado *swab* estéril por atapetamento, cobrindo toda a superfície do ágar Mueller Hinton. Os discos de cada antibiótico foram depositados com auxílio de pinça esterilizada, guardando uma distância de 30 mm entre cada disco. As placas foram incubadas a 37 °C/18 h.

Como controles utilizou-se etanol 70% e NaCl 0,9% estéril.

A leitura do teste se deu através da produção de halo ao redor do disco de antibiótico, que caracteriza a ausência de crescimento. O tamanho do halo (mm) medido por régua determina se a cepa é sensível, intermediária ou resistente ao antimicrobiano empregado. Contudo, este estudo só levou em conta sensibilidade e resistência, uma vez que o documento regulador é utilizado para espécies patogênicas, e não bactérias ácido-láticas com potencial probiótico.

5.9 SOBREVIVÊNCIA ÀS CONDIÇÕES GASTRINTESTINAIS

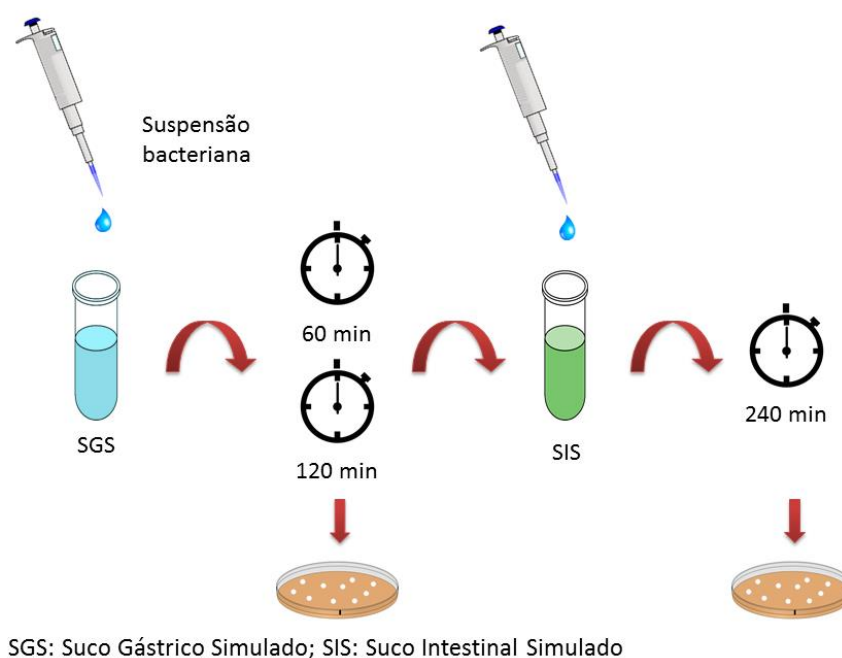
O preparo dos sucos gástrico e intestinal simulados seguiram o descrito por Farias et al. (2019).

Para o suco gástrico simulado (SGS) foi preparada uma solução contendo 9 g/L de cloreto de sódio contendo 3,0 g/L de pepsina com pH ajustado para 2,1 com HCl (Vetec®). O suco intestinal simulado (SIS) foi preparado dissolvendo os sais biliares em solução de 6,5 g/L NaCl (Química Moderna®), 0,835 g/L KCl (Merck®) e 0,22 g/L CaCl₂ (Merck®), para concentração de 3,0g/L, com pH final de 7,2,

regulado com NaOH 0,1 N (Química Moderna®). Para a simulação foram utilizados 9 mL de SGS e SIS.

Tubos de caldo MRS foram incubados com o microrganismo a 37 °C/24h sob anaerobiose. Após o cultivo, uma alíquota de 1 mL foi retirada e diluída seriadamente, antes do contato com o suco ácido (contagem inicial) e com 60 e 120, correspondendo à fase gástrica. Em seguida, 1 ml foi aliqotado do tubo referente aos 120 minutos e transferido para o SIS, equivalendo a 240 minutos de digestão simulada (Figura 1). Os tubos inoculados permaneceram a 37 °C, com homogeneizações periódicas.

Figura 1 – Simulação das condições gastrintestinais.



Fonte: Elaboração própria.

As colônias foram contadas após 48h de crescimento em estufa e os resultados expressos em UFC/mL.

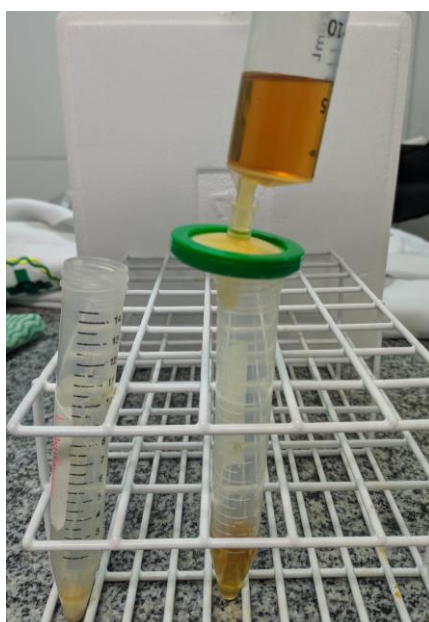
Para avaliar a ação protetiva do FOS, os microrganismos foram incubados com 1,5% desta fibra, seguindo o mesmo método de simulação do ambiente gastrointestinal.

5.10 ATIVIDADE ANTIOXIDANTE

As três cepas utilizadas no estudo foram submetidas a dois diferentes métodos de avaliação de atividade antioxidante.

As bactérias foram incubadas conforme 5.2. Em seguida, os tubos com as culturas foram centrifugados (3600 rpm/15 min) a fim de separar o conteúdo celular do líquido metabólico. O líquido foi filtrado em filtro de seringa, a fim de remover qualquer resíduo celular (Figura 2).

Figura 2 – Filtragem da cultura em MRS para remoção de células bacterianas.



Fonte: Acervo da autora.

O líquido resultante foi avaliado de acordo com a capacidade de sequestrar o radical 2,2'-azinobis-3-etilbenzotiazolina-6-ácido sulfônico (ABTS⁺) e o radical livre 2,2-difenil1-picrilhidrazil (DPPH). O método do ABTS⁺ seguiu o proposto por Re et al. (1999). A avaliação do sequestro de DPPH baseou-se no método de Blois (1958).

Para controle negativo utilizou-se água destilada e MRS caldo. Como controles positivos ácido ascórbico, butilhidroxianisol (BHA) e butilhidroxitolueno (BHT) foram empregados.

5.11 ELABORAÇÃO DO SUCO POTENCIALMENTE SIMBIÓTICO

O abacaxi (*Ananas comosus* (L.)) foi adquirido em mercado local e lavado em água corrente. Em seguida, os frutos foram sanitizados em solução clorada a 150 ppm por 15 minutos. As partes não comestíveis foram eliminadas e a polpa foi destinada ao preparo do suco. Para o preparo do suco utilizou-se a concentração de 60% de polpa (BRASIL, 2003) e 10% de sacarose. De acordo com os resultados do item 6.2, posteriormente descrito, a concentração de fruto-oligossacarídeo adicionada foi de 1,5%.

O suco produzido foi pasteurizado em banho-maria a 65 °C durante 30 minutos e, logo em seguida, submetido a um banho de gelo durante 15 minutos (DESHAWARE et al., 2019).

Figura 3 – Suco em banho-maria.



Fonte: Acervo da autora.

5.11.1 Adição de *L. Casei*

A bactéria foi incubada como descrito no item 5.2. Para obter a massa celular, o tubo foi submetido à centrifugação, com descarte do sobrenadante. As células foram suspensas em 10 ml do próprio suco de abacaxi e a suspensão foi adicionada ao suco na proporção de 10% em condições assépticas. O suco foi armazenado por 14 dias a $4 \pm 1^\circ\text{C}$, sendo avaliado físico-quimicamente nos dias 0, 3, 7 e 14.

Aproximadamente 10 logs de UFC/ml foram adicionados à bebida. Além da formulação simbiótica, foi preparado o suco controle, sem a bactéria e sem o FOS.

5.12 DETERMINAÇÃO DA COMPOSIÇÃO CENTESIMAL DOS SUCOS

Para determinação da composição centesimal foram realizadas análises físico-químicas (Quadro 1) de cinzas, umidade, proteína, lipídio, açúcares totais e redutores, em triplicata, com os valores médios obtidos expressos em g/100g (IAL, 2008). O valor energético total (VET) foi calculado pelo somatório das calorias fornecidas pelos macronutrientes, isto é, 9 Kcal/g para lipídios (LIP) e 4 Kcal/g para carboidratos (CHO) e proteínas (PTN).

Quadro 1 – Métodos adotados para determinação da composição centesimal mínima das bebidas tropicais de abacaxi, de acordo com o IAL (2008).

Análise	Método
Cinzas	Secagem direta em estufa a 105 °C (dessecação)
Umidade	Incineração em Mufla à 550°C
Proteínas	Determinação de nitrogênio pelo método de digestão de Kjeldahl e conversão para proteína através do fator 6,25
Lipídio	Extração direta em Soxhlet por meio de refluxo de solvente orgânico
Açúcares redutores	Reação com solução cupro-alcalina
Açúcares não redutores	Inversão ácida dos açúcares

5.13 CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA E MICROBIOLÓGICA DO SUCO DE ABACAXI DURANTE ARMAZENAMENTO

O suco potencialmente simbiótico e o controle foram mantidos por 14 dias a $4\pm1^{\circ}\text{C}$. As amostras foram processadas nos dias 0 (dia do preparo), 3, 7 e 14. As análises físico-químicas seguiram a metodologia do Instituto Adolfo Lutz (2008), conforme a Tabela 1:

Tabela 1 – Métodos adotados para caracterização físico-química das bebidas funcionais durante armazenamento, de acordo com o IAL (2008).

Análise	Método
Sólidos solúveis totais	Leitura em refratômetro, com os resultados expressos em °Brix
Acidez total titulável	Diluição das amostras em água destilada, seguida de titulação com solução de NaOH 0,1 N, adicionando o indicador fenolftaleína
pH	Leitura em potenciômetro digital

As análises microbiológicas incluíram a contagem de células viáveis e a sobrevivência em trato gastrointestinal simulado. Realizando manobras de amostragem apropriadas, os métodos de avaliação seguiram os mesmos descritos nos itens 5.3 e 5.9.

Os testes foram executados em triplicata.

5.14 ANÁLISE ESTATÍSTICA

O processamento estatístico utilizou testes de estatística descritiva (média e desvio padrão) e inferencial (Anova One-Way e teste de Tukey) para determinação de diferenças estatisticamente significantes entre os tratamentos aplicados. Os dados foram tratados no software Origin 8.1, adotando nível de confiança de 95% ($p < 0,05$).

6 RESULTADOS E DISCUSSÃO

6.1 IDENTIFICAÇÃO MOLECULAR

Para a microbiologia, a identificação específica da cepa é primordial, uma vez que ela pode não compartilhar das mesmas características que outras de sua espécie. No caso de probióticos, Vitetta et al. (2017) confirmam que a seleção dessas bactérias ácido-láticas deve ocorrer através da informação genômica, de forma que se possa escolher qual a cepa apresenta as características desejadas a determinado estudo.

Conforme identificado pela farmácia de manipulação, a cepa adquirida era, de fato, um *Lactobacillus rhamnosus*. Com a amplificação do DNA foi possível ainda determinar que se trata da cepa *L. rhamnosus* GG ATCC 53103 com 100% de similaridade. As duas outras espécies (*L. casei* ATCC 334 e *L. acidophilus* ATCC 4356) foram identificadas pela Coleção de Culturas de Microrganismos do Departamento de Antibióticos.

6.2 VIABILIDADE CELULAR NA PRESENÇA DE FRUTO-OLIGOSSACARÍDEO *in vitro*

O ensaio de viabilidade é de extrema importância na elaboração de um alimento que contenha microrganismos potencialmente probióticos, a fim de garantir as quantidades exigidas em legislação.

Este ensaio de viabilidade celular na presença de FOS foi conduzido *in vitro*, antes de aplicar diretamente aos sucos, a fim de observar qual concentração (1%, 1,5% ou 2%) é capaz de promover o aumento do número de células viáveis.

A Tabela 2 traz os valores obtidos nos experimentos.

Tabela 2 – Viabilidade celular de *Lactobacillus* spp. em diferentes concentrações de fruto-oligossacarídeo.

Concentração de FOS	Bactéria		
	<i>L. rhamnosus</i>	<i>L. casei</i>	<i>L. acidophilus</i>
	log UFC/ml		
0 (Sem FOS)	9,28 ± 0,02 ^d	9,66 ± 0,03 ^c	9,47 ± 0,03 ^c
1%	9,58 ± 0,03 ^c	9,6 ± 0,01 ^d	9,8 ± 0,03 ^a
1,5%	11,72 ± 0,02 ^a	11,31 ± 0,71 ^a	11,5 ± 0,4 ^a
2%	9,75 ± 0,10 ^b	10,85 ± 0,06 ^b	10,31 ± 0,08 ^b

Valores (médias ± desvio padrão) com letras minúsculas diferentes na mesma linha diferem estatisticamente ao nível de 5%. Anova One-Way e teste de Tukey.

Conforme já mencionado anteriormente, os prebióticos como os FOS atuam por intermédio de uma estimulação do crescimento e/ou atividade de bactérias residentes da microbiota intestinal (ROBERFROID et al., 2010; SIVIERI et al., 2014; DELGADO; TAMASHIRO, 2018).

Considerando os dados coletados nesta pesquisa, a adição de 1% de FOS aumentou significativamente ($p < 0,05$) a viabilidade de duas espécies, a saber, *L. rhamnosus* GG ATCC 53103 e o *L. acidophilus* ATCC 4356. No *L. casei* ATCC 334 a melhoria ocorreu no acréscimo de 1,5%.

Outros tipos de prebióticos, como isomaltooligossacarídeo, galactooligossacarídeo e gentiooligossacarídeo, também são descritos como agregadores na viabilidade celular. Saminathan et al (2011) experimentaram diferentes espécies de lactobacilos na presença de 1% desses prebióticos. Os achados indicam que apesar do aumento nas contagens de células bacterianas, o número variou entre espécies e, ainda mais, entre cepas.

Acevedo-Martínez et al. (2018) constataram aumento da contagem celular de *L. casei*, quando o meio de cultivo foi suplementado com 5% de FOS. Isomaltooligossacarídeo é capaz de promover aumento da viabilidade de *L. rhamnosus*, na proporção de 1% ao longo de semanas, conforme verificado em experimento conduzido em queijo cheddar (LIU et al., 2015). Já para Bernal-Castro et al. (2019) a concentração de FOS que concedeu melhorias na recuperação das

células viáveis foi de 1%.

As mesmas autoras (BERNAL-CASTRO et al, 2019) executaram teste com 5% de FOS no MRS, porém não obtiveram resultados satisfatórios, o que implica dizer que a maior concentração de prebióticos não necessariamente aumenta a viabilidade celular (NUNPAN; SUWANNACHART; WAYAKANON, 2019). Estes achados são similares aos levantados no presente estudo para todas as espécies estudadas, onde não houve diferença significativa na contagem de *L. rhamnosus* GG ATCC 53103 a 2% de FOS, quando comparado à amostra sem prebiótico.

Para as três espécies torna-se perceptível que a melhor concentração a ser incorporada é a de 1,5%, onde se obtém um aumento de aproximadamente 2,04 logs de unidades formadoras de colônia.

6.3 SCREENING DE ENZIMAS DE INTERESSE INDUSTRIAL

Conforme descrito na Tabela 3, as três espécies de *Lactobacillus* spp. são produtoras das enzimas amilase, celulase, protease e lipase. Esses achados são interessantes do ponto de vista econômico, visto que essas bactérias podem ser empregadas em larga escala para aproveitamento industrial. De acordo com Rana et al. (2017), a amilase é importante para a clarificação de sucos, panificação e até mesmo para a melhoria da saúde de animais de criação. Padmavathi et al. (2018) e Caminero et al. (2019) relatam uma grande variedade de *Lactobacillus* spp. como produtores desta enzima.

Tabela 3 – Screening de enzimas de interesse industrial.

Enzima	<i>L. rhamnosus</i>	<i>L. casei</i>	<i>L. acidophilus</i>
Amilase	+	+	+
Celulase	+	+	+
Protease	+	+	+
Lipase	+	+	+
Inulinase	Não produtor	Não produtor	Não produtor

A celulase é uma enzima ausente no organismo humano (DHINGRA et al., 2012). Na microbiologia, é bem estabelecido que os fungos são bons produtores dessa enzima (SINGH et al., 2021), mas a literatura também relata alguns gêneros bacterianos, como *Bacillus* spp. (KURT; CEKMECELIOGLU, 2021; PHAM et al., 2022), *Aeromonas* spp., *Paenibacillus* spp. (ISLAM; ROY, 2018). Nossa pesquisa ajuda a ampliar as opções de bactérias produtoras de celulase, para aplicação nos mais diversos fins.

Graças a hidrólise de alérgenos, produção de hidrolisado proteico e liberação de peptídeos bioativos (EDALATI et al., 2019), as proteases tem um considerável valor comercial. De acordo com a Tabela 2, as três espécies escolhidas neste trabalho produzem esta enzima. Em estudo conduzido por Solieri et al. (2018), foi observado que *Lactobacillus casei* PRA205 e *Lactobacillus rhamnosus* PRA331 são bons produtores de proteases. Moosavi-Nasab et al. (2018) relatam o mesmo para a sua cepa de *L. casei*. Da mesma forma, Tan e colaboradores (2020) empregaram *Lactobacillus acidophilus* FTDC3871 para extração de quitina da casca de camarões, por ação proteolítica, obtendo bons resultados.

Conforme descrito, a lipase tem grande valor comercial, graças ao seu auxílio na digestão, na produção de queijos, de óleos e gorduras (CHANDRA; SINGH; ARORA, 2020). Todas as cepas utilizadas neste trabalho são produtoras desta enzima. Estes achados são compatíveis com o descrito por diferentes autores, onde diversas espécies de *Lactobacillus* apresentam atividade lipolítica, como *L. fermentum* (ABEER MOHAMMED; HEGAZY; SALAH, 2021), *L. brevis* (KHAN et al., 2018), *L. casei* (MOOSAVI-NASAB et al., 2018; GUAN et al., 2020), *L. plantarum* (KHAN et al., 2019; KIM; LIM, 2020), *L. amylovorus* (MAROJU et al., 2021).

Nenhuma das cepas foi capaz de produzir inulinase. A literatura científica descreve os fungos como os microrganismos de destaque na produção destas enzimas, com destaque aos gêneros *Aspergillus* spp. e *Fusarium* spp. (KAMBLE et al., 2019; GERMEC et al.; GURLER et al.; SINGH et al., 2020). Entretanto, Boger e colaboradores (2018) observaram produção de exo-inulinase na espécie *Lactobacillus paracasei* W20. Outros gêneros bacterianos produtores da enzima são *Staphylococcus* spp. (SELVAKUMAR; PANDEY, 1999),

Streptomyces sp. (SHARMA et al., 2006), *Klebsiella* e *Bacillus* spp. com características halofílicas ou termofílicas (FACHRIAL et al., 2019; ULLAH et al., 2022).

6.4 ATIVIDADE ANTIMICROBIANA

O primeiro teste realizado para verificar a atividade antimicrobiana do líquido metabólico resultante da fermentação dos carboidratos do meio de cultura pelo *L. rhamnosus* GG foi o de difusão em ágar, através da perfuração de poços.

A primeira execução não demonstrou nenhuma atividade biológica frente a *E. coli*, *Salmonella typhimurium*, *Staphylococcus aureus* e *Listeria monocytogenes*. Associou-se a inatividade à espessura do meio de cultura nas placas, inferior a 4 mm, o que poderia ter alterado a capacidade de difusão dos compostos produzidos pelo metabolismo do lactobacilo. De acordo com Ostrosky et al. (2008), a espessura e o cuidado na forma de distribuição do ágar na placa de Petri são parâmetros essenciais para maior confiabilidade do teste, uma vez que reduz a presença de bolhas, sobreposições e estrias.

As duas repetições seguintes, com meio mais homogêneo demonstraram resultados similares, isto é, de ausência de atividade inibitória frente a patógenos alimentares.

As espécies consideradas como probióticas pela ANVISA costumam apresentar ação antibacteriana, como descrito por Chowdhury e Islam (2016) em experimento conduzido com diferentes espécies de lactobacilli observou uma boa inibição por parte de *L. casei*. Por outro lado, outras espécies do mesmo gênero não apresentaram atividade antimicrobiana contra as cepas utilizadas, assim como no presente estudo.

Da mesma forma, utilizando o mesmo método de difusão em ágar através de poços, Inglin et al. (2015) não obteve resultados satisfatórios com 21 espécies de *L. rhamnosus*, onde apenas dois isolados foram capazes de inibir *in vitro* o crescimento de bactérias patogênicas.

Devido a vários relatos científicos apontando o gênero *Lactobacillus* spp. como antagonista a patógenos alimentares (JACOBSEN et al., 1999; HÜTT et al.; KEERSMAECKER et al., 2006; CAGGIA et al.; SZAJEWSKA; KOŁODZIEJ, 2015;

BERISTAIN-BAUZA et al., 2016; ALLONSIUS et al., 2017), portanto, decidiu-se utilizar mais dois testes de atividade antimicrobiana, a fim de comprovar se realmente havia inatividade.

No método de co-incubação esperou-se que a cepa potencialmente probiótica produza, através de seu metabolismo, compostos secundários com atividades biológicas. Nesse ensaio, os metabólitos secundários devem inibir o crescimento do patógeno que está em sua presença (TEJERO-SARIÑENA et al., 2012).

Na presença de *L. rhamnosus* GG ATCC 53103, *L. casei* ATCC 334 e *L. acidophilus* ATCC 4356 nenhum dos microrganismos-teste tiveram seu crescimento anulado ou reduzido. Corroborando outros estudos, Annuk et al. (2003) enfatiza a cepa-dependência para a comprovação de atividade inibitória. Os autores ainda apontam que culturas homofermentativas apresentam baixo potencial de inibição quando em presença de outros microrganismos.

Diferentes espécies de *Lactobacillus* não foram capazes de inibir o crescimento de *Salmonella enterica*, *Escherichia coli* e *Clostridium perfringens* pelo método de ágar-difusão, utilizando o líquido sobrenadante sem células (DEC et al., 2016). Os mesmos autores encontraram resultados positivos para os mesmos microrganismos indicadores aplicando o método de blocos de ágar.

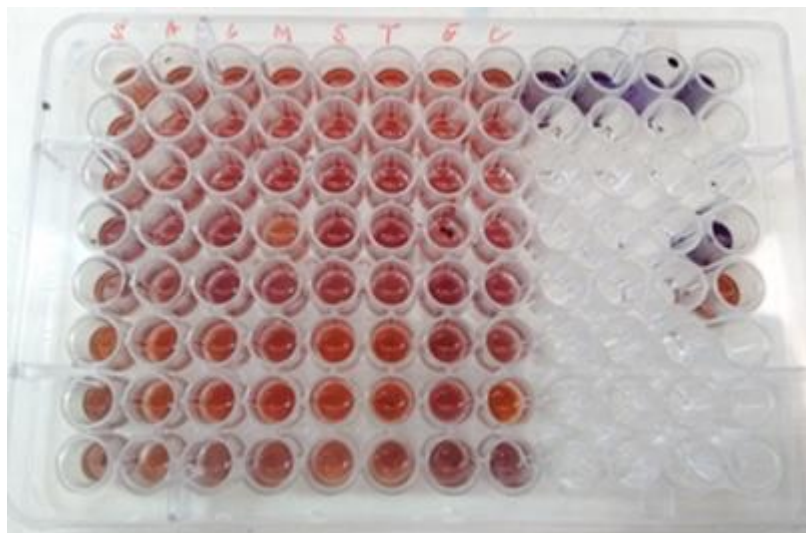
Jang, Lee e Paik (2019) observaram fraca atividade de *L. rhamnosus* GG ante a *S. typhimurium*, tal como as observações de nosso estudo. Da mesma forma descreveram Das, Joseph e Iyer (2016) e Faghfoori et al (2017) diante da espécie *S. aureus*. O *L. rhamnosus* também apresentou pobre ação antimicrobiana em estudos com *L. monocytogenes* (MASHAK, 2016).

Na pesquisa conduzida por Das, Joseph e Iyer (2016) concluiu-se o mesmo que se tem relatado nesta sessão para a espécie *L. acidophilus*. Mesmo com bacteriocinas isoladas, a cepa *L. acidophilus* LA5 não consegue reduzir o crescimento *in vitro* de *L. monocytogenes* (MORADI; MARANI; TAJIK, 2019).

Os mesmos resultados foram encontrados quando se aplicou o teste de microdiluição do SLC *in vitro* (Figura 4), que é o método preferido e mais utilizado, uma vez que se pode controlar as concentrações do composto a ser testado. Os dados coletados não são condizentes com alguns achados da literatura científica

(SZAJEWSKA; KOŁODZIEJ, 2015; ARYANTINI et al, 2016; BERISTAIN-BAUZA et al., 2016; ALLONSIUS et al., 2017), mas demonstram que nem todas as cepas ácido-láticas podem ser consideradas probióticas antes de serem exaustivamente estudadas quanto às alegações de funcionalidade (SHOKRYAZDAN et al., 2014).

Figura 4 – Resultado de teste de microdiluição em placa de 96 poços.



AS: *Staphylococcus aureus*; LM: *Listeria monocytogenes*; ST: *Salmonella typhimurium*;
EC: *Escherichia coli*.

Sobre a hipótese de que nem todas as bactérias ácido-láticas serem denominadas probióticas, Dincer e Kivanc (2019) afirmam o mesmo, ao notarem pouca atividade contra patógenos alimentares gram-negativos ao testar líquido metabólico livre de células.

Com relação à inatividade aparente do *L. casei*, outros autores trazem relatos semelhantes. As cepas *L. casei* 431 e R-68 reduziram pobremente o crescimento laboratorial de *L. monocytogenes*, *E. coli*, *Salmonella typhi* e *S. aureus*. (PATO et al, 2017; RAJARAJAN et al, 2018; MORADI; MARANI; TAJIK, 2019).

Outras espécies consideradas potencialmente probióticas também são relatadas como pobres agentes bacteriostáticos e bactericidas. Por exemplo, *L. alimentarius* mostrou-se fraco inibidor de *E. coli*, tanto quanto *L. lactis* para *E. coli*, *S. aureus*, *L. monocytogenes* e *Salmonella typhimurium* (MASHAK, 2016). *L. plantarum* apresentou pobre poder bacteriostático sobre *E. coli*, *S. typhimurium* e *S. aureus*, de acordo com Shaikhin e colaboradores (2016), assim como *L. reuteri*

ante ao *S. aureus*.

Além dos indicadores empregados neste estudo, outras pesquisas envolvendo diferentes espécies bacterianas apontam a baixa (ou mesmo ausência de) atividade inibitória de *Lactobacillus* spp. Pode-se citar aqui *Yersinia enterocolitica* (KUMARI et al, 2016), *Serratia marcescens*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae*, *Enterococcus faecalis*, *Bacillus cereus* (FAGHFOORI et al, 2017), *C. albicans* (SHAIKHIN et al., 2016; FAGHFOORI et al, 2017) e *Salmonella typhi* (DAS; JOSEPH; IYER, 2016; PATO et al., 2017).

Os testes de atividade antimicrobiana também foram realizados na presença de FOS, nas diferentes concentrações propostas (1%, 1,5% e 2%), porém apresentaram os mesmos resultados negativos descritos acima.

Neste trabalho foi testada a atividade antimicrobiana apenas com o líquido metabólico, não tendo sido considerado o extrato intracelular ou as próprias células bacterianas.

6.5 PERFIL DE SUSCETIBILIDADE A ANTIMICROBIANOS

A triagem de resistência e sensibilidade a antibióticos tem por finalidade avaliar a segurança no uso da cepa em estudo, uma vez que ela não deve apresentar resistência a uma grande quantidade desses fármacos.

De forma natural, o gênero *Lactobacillus* apresenta resistência a certos antimicrobianos, chamada de resistência intrínseca, assim como todas as outras espécies de bactérias (CHARTERIS et al., 1998). Os resultados obtidos estão expressos na Tabela 3.

Tabela 4 – Perfil de suscetibilidade aos antibióticos clínicos através de medição dos halos de inibição (mm).

Antibiótico	Halo de inibição em mm		
	<i>L. rhamnosus</i>	<i>L. casei</i>	<i>L. acidophilus</i>
VAN	0	0	0
GEN	0	0	0
ERI	26,0 ± 2	30,7 ± 1,15	28,35 ± 1,5
PEN	29,3 ± 1,15	30,3 ± 0,6	29,65 ± 0,9
TET	30,6 ± 1,15	30,7 ± 1,15	30,5 ± 1,15

AMP	29,3 ± 1,15	36,7 ± 1,15	33,0 ± 1,15
------------	-------------	-------------	-------------

Van: vancomicina; Gen: gentamicina; Eri: eritromicina; Pen: penicilina; Tet: tetraciclina; Amp: ampicilina. Valores em média ± desvio padrão.

De acordo com os resultados obtidos no teste, pode-se interpretar da seguinte forma:

Tabela 5 – Perfil de suscetibilidade aos antibióticos: interpretação.

Antibiótico	Halo de inibição em mm		
	<i>L. rhamnosus</i>	<i>L. casei</i>	<i>L. acidophilus</i>
VAN	R	R	R
GEN	R	R	R
ERI	S	S	S
PEN	S	S	S
TET	S	S	S
AMP	S	S	S

R: Resistente; S: Sensível

Nenhuma cepa apresentou resistência à penicilina, eritromicina, tetraciclina e ampicilina, ao contrário do relatado por Rajoka e colaboradores (2017), que isolaram *L. rhamnosus* de leite humano e observaram um perfil amplo de resistência a diferentes antibióticos, tais como estreptomicina, gentamicina e os já citados.

A resistência ao antimicrobiano vancomicina é um atributo nativo do *L. rhamnosus* (LIU et al., 2009) e é comumente encontrado em outras espécies de Lactobacilli (HOLLIMAN; BONE; RUOFF et al., 1988). Essa característica não é transferível geneticamente a outras espécies (MORROW et al., 2012).

Outros autores também encontraram o mesmo padrão de resistência à vancomicina em outras espécies, como *L. plantarum* (FAGHFOORI et al, 2017; PARTOVI; GANDOMI; BASTI, 2019), *L. casei* (KUMARI et al., 2016), *L. paracasei* (KUMARI et al., 2016; FAGHFOORI et al, 2017), *L. buchneri* (KUMARI et al., 2016).

A resistência à eritromicina, apresentada por todas as três espécies estudadas, também é corroborada por outros autores (ARYANTINI et al, 2016;

PATO et al, 2017; SCHMITT et al, 2018). Os outros achados do perfil de sensibilidade traçado neste trabalho são semelhantes aos de outros grupos de pesquisa (KUMARI et al., 2016; FAGHFOORI et al, 2017; SCHMITT et al, 2018; MALILAY et al, 2019).

O perfil de resistência observado, como à gentamicina e à vancomicina, que são antimicrobianos de amplo espectro, não é motivo de preocupação clínica, uma vez que as bactérias são satisfatoriamente inibidas por outras drogas disponíveis (CAGGIA et al., 2015).

6.6 CONDIÇÕES GASTRINTESTINAIS SIMULADAS

Os resultados da avaliação *in vitro* da sobrevivência de *L. rhamnosus* GG ATCC 53103, *L. casei* ATCC 334 e *L. acidophilus* ATCC 4356 livres após exposição aos fluidos gástrico e intestinal simulados estão elencados nas Tabelas 5, 6 e 7.

Tabela 6 – Viabilidade de células livres de *Lactobacillus rhamnosus* ATCC 53103 com diferentes concentrações FOS aos sucos gástrico e intestinal simulados.

Tempo de análise (min)	<i>L. rhamnosus</i>			
	Sem FOS	1%	1,5%	2%
	log UFC/ml			
0 (Contagem Inicial)	11,89 ± 0,01 ^{Ab}	10,86 ± 0,06 ^{Ba}	10,84 ± 0,28 ^{Ba}	11,56 ± 0,04 ^{Ca}
60 min (SGS)	11,20 ± 0,08 ^{Aa}	10,54 ± 0,25 ^{Bb}	10,62 ± 0,67 ^{Bb}	11,43 ± 0,19 ^{Ca}
120 (SGS)	10,00 ± 1,35 ^{Ab}	8,87 ± 0,04 ^{Bb}	10,79 ± 0,02 ^{Ca}	10,51 ± 0,17 ^{Cb}
240 (SIS)	10,72 ± 0,85 ^{Ab}	8,93 ± 0,04 ^{Bc}	9,41 ± 0,06 ^{Cb}	9,57 ± 0,31 ^{Cc}

SGS: Suco Gástrico Simulado; SIS: Suco Intestinal Simulado.

Valores (médias ± desvio padrão) com letras maiúsculas diferentes na mesma linha diferem estatisticamente ao nível de 5%. Letras minúsculas diferentes na mesma coluna diferem estatisticamente entre si. Anova One-Way e teste de Tukey.

Observou-se que não houve diferença significativa no teste executado sem adição de fruto-oligossacarídeo. Com a concentração de 1% de FOS ocorreu uma redução significativa após 120 minutos. Esse tempo corresponde ao período de exposição ao suco gástrico simulado, contendo pepsina e baixo pH (2,1). Em

pesquisa conduzida por Albuquerque et al. (2018), determinou-se que O FOS não interferiu na viabilidade das células de *L. rhamnosus* GG em produtos de soja submetidas à simulação gastrointestinal.

Na concentração de 1,5% verificou-se uma discreta redução na viabilidade do *L. rhamnosus* em toda a fase gástrica, havendo maior queda na contagem celular a partir dos 240 minutos de teste. A concentração de 2% demonstrou resultados semelhantes à concentração de 1%.

Pode-se concluir que para a espécie *L. rhamnosus* GG ATCC 53103 a adição de FOS, seja na concentração de 1%, 1,5% ou 2%, não apresenta efeitos relevantes sobre a sua viabilidade ao longo do trato gastrointestinal *in vitro* ($p > 0,05$). De acordo com o método executado, a bactéria por conta própria consegue se manter acima dos valores recomendados para ingestão diária.

Pitino et al (2010) realizaram simulação *in vitro* com seis diferentes linhagens de *L. rhamnosus*. Todas apresentaram boa taxa de sobrevivência, onde três delas chegaram a se multiplicar ao longo das passagens gástrica e duodenal simuladas.

Do ponto de vista econômico, a associação de fruto-oligossacarídeo com *L. rhamnosus* GG ATCC 53103 não é vantajosa, de acordo com os dados obtidos. Contudo, se for desejável obter outros efeitos considerados funcionais, a concentração recomendada seria de 1,5%.

Tabela 7 – Viabilidade de células livres de *Lactobacillus casei* ATCC 334 com diferentes concentrações FOS aos sucos gástrico e intestinal simulados.

Tempo de análise (min)	<i>L. casei</i> ATCC 334			
	Sem FOS	1%	1,5%	2%
	log UFC/ml			
0 (Contagem Inicial)	11,25 ± 0,30 ^{Aa}	11,57 ± 0,04 ^{Aa}	10,42 ± 0,03 ^{Ba}	11,50 ± 0,14 ^{Ca}
60 min (SGS)	10,49 ± 0,34 ^{Ba}	11,52 ± 0,04 ^{Ba}	10,57 ± 0,27 ^{Ca}	9,15 ± 0,21 ^{Dc}
120 (SGS)	8,42 ± 0,60 ^{Cb}	10,13 ± 0,15 ^{Bb}	10,84 ± 0,01 ^{Ca}	9,82 ± 0,19 ^{Db}
240 (SIS)	8,90 ± 0,08 ^{Db}	10,34 ± 0,32 ^{Bb}	9,75 ± 0,33 ^{Cb}	9,84 ± 0,07 ^{Cb}

SGS: Suco Gástrico Simulado; SIS: Suco Intestinal Simulado.

Valores (médias ± desvio padrão) com letras maiúsculas diferentes na mesma linha diferem

estatisticamente ao nível de 5%. Letras minúsculas diferentes na mesma coluna diferem estatisticamente entre si. Anova One-Way e teste de Tukey.

Na simulação com a espécie *L. casei* ATCC 334, evidenciou-se que a adição de 1,5% de FOS ao meio de cultivo é capaz de promover a proteção de forma significativa no ambiente gastrointestinal simulado. De acordo com os achados da Tabela 6, nos testes executados sem adição de FOS e com adição de 1,5% do sacarídeo, as contagens de células viáveis da cepa bacteriana começam a declinar de forma significativa aos 120 minutos. De forma semelhante observa-se na adição de 2%, com perdas acentuadas ainda na segunda etapa do experimento (60 minutos no SGS).

Portanto, para a cepa *L. casei* ATCC 334, a preservação de células que podem chegar viáveis no sítio alvo, isto é, o intestino grosso, é alcançada por meio da adição de 1,5% de FOS de forma *in vitro*.

Experimentando amido de batata, inulina e fibra de *Plantago psyllium* como agentes encapsulantes sobre *L. plantarum* e *L. casei*, Peredo et al. (2016) denotaram eficiente preservação de células viáveis. Comparando às células submetidas ao processo digestivo *in vitro*, o *L. plantarum* acompanhado de prebióticos manteve-se dentro dos valores aceitáveis para exercício de suas atividades probióticas.

Apesar de conduzir estudo com bactérias encapsuladas em alginato-gelatina, Matthews (2017) apontou uma maior recuperação microbiana nas amostras contendo prebióticos (inulina e lactulose) em ambiente gastrointestinal mimetizado. Ambas as espécies utilizadas, *L. acidophilus* e *L. casei*, apresentaram contagens satisfatórias.

Guergoletto et al (2010) constataram aumento substancial da recuperação celular de *L. casei* (LC-1) aderido a fibras após passagem por ambiente gastrointestinal simulado, quando comparado a células livres da bactéria. Já Blaiotta et al (2013), trabalhando com fibras de castanha montella, verificaram efeito protetor apenas na intestinal, não na fase gástrica, tanto para *L. casei* Lbc496 quanto para *L. rhamnosus* ATCC 53103, mesma cepa utilizada no nosso estudo.

Tabela 8 – Viabilidade de células livres de *Lactobacillus acidophilus* ATCC 4356 com diferentes concentrações FOS concentrações FOS aos sucos gástrico e intestinal simulados.

Tempo de análise (min)	<i>L. acidophilus</i>			
	Sem FOS	1%	1,5%	2%
	log UFC/ml			
0 (Contagem Inicial)	8,54 ± 0,09 ^{Cb}	10,41 ± 0,15 ^{Ba}	9,54 ± 0,09 ^{Aa}	9,46 ± 0,28 ^{Aa}
60 min (SGS)	9,67 ± 0,19 ^{Aa}	10,48 ± 0,11 ^{Ba}	9,69 ± 0,55 ^{Ca}	10,35 ± 0,28 ^{Da}
120 (SGS)	8,45 ± 0,21 ^{Ab}	9,56 ± 0,1 ^{Bb}	9,98 ± 0,19 ^{Ca}	8,54 ± 0,34 ^{Db}
240 (SIS)	8,22 ± 0,06 ^{Cb}	9,0 ± 0,02 ^{Cc}	8,0 ± 0,01 ^{Bb}	8,0 ± 0,01 ^{Dc}

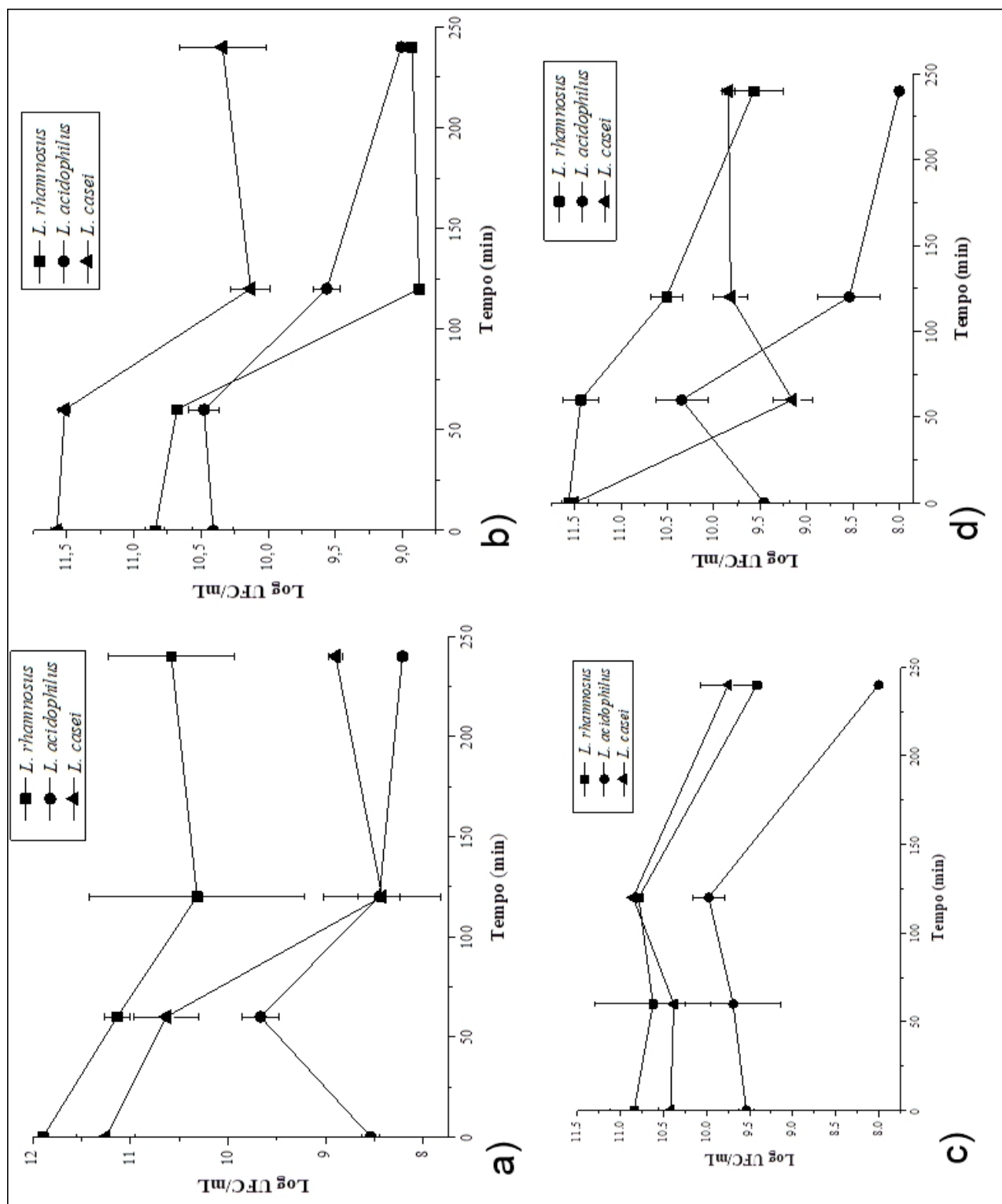
SGS: Suco Gástrico Simulado; SIS: Suco Intestinal Simulado.

Valores (médias ± desvio padrão) com letras maiúsculas diferentes na mesma linha diferem estatisticamente ao nível de 5%. Letras minúsculas diferentes na mesma coluna diferem estatisticamente entre si. Anova One-Way e teste de Tukey.

Conforme enunciado na Tabela 7, a concentração de 1,5% da fibra é a mais efetiva no que diz respeito à redução das perdas celulares em ambiente gastrointestinal simulado para *L. acidophilus* ATCC 4356. Na presença de 1,5% de FOS a viabilidade é preservada estatisticamente até 120 minutos de experimento.

É possível observar a comparação entre as espécies no teste de simulação gastrointestinal sem e com FOS na Figura 5. No primeiro gráfico (Figura 5a), que representa os resultados da simulação sem FOS, evidencia-se o melhor desempenho da espécie *L. rhamnosus*, conforme discutido acima. Sem a adição do FOS percebe-se a abrupta redução do *L. casei* aos 120 minutos.

Figura 5 – Comparação entre as espécies no teste de simulação gastrointestinal. a) sem fruto-oligosacarídeo; b) 1,0% de FOS; c) 1,5% de FOS; d) 2,0% de FOS.



Com a adição de 1% da fibra alimentar (Figura 5b) evidencia-se um padrão de viabilidade relativamente mais equilibrado. Contudo, a suplementação de 1,5% apresenta a menor perda celular, sobretudo na espécie *L. casei*. Ao contrário do que se esperava, a maior concentração de FOS não implica em maior sobrevivência dos microrganismos testados, indicando outra vez que existem doses específicas para o efeito protetor sobre as cepas.

Apesar da redução significativa entre o total de células inoculadas e a quantidade recuperada ao fim do experimento, observa-se que todas as três espécies apresentam relativa capacidade de sobrevivência às condições simuladas do trato gastrointestinal. De acordo com os valores finais obtidos, as cepas seriam aceitas na legislação internacional (FAO/WHO, 2002).

Em estudo conduzido por Poletto et al. (2019), a espécie *L. acidophilus* sofreu perda de aproximadamente 7 ciclos logarítmicos ao final da simulação gastrointestinal. A mesma pesquisa encapsulou as células bacterianas em três tipos de matrizes diferentes, obtendo resultados dentro dos padrões legais internacionais.

Em experimentação com mousses simbióticos, a associação inulina-fruto-oligossacarídeo habilitou o *L. acidophilus* a resistir mais efetivamente ao trânsito intestinal simulado (BURITI; CASTRO; SAAD, 2010). O mesmo se deu com a cepa *L. acidophilus* DSM 20079, conforme relato de Nazzarro et al (2012), na adição de inulina e pectina. Já *L. acidophilus* ATCC 4356 não sofreu interferência positiva ou negativa relacionada à presença de FOS e de GOS na concentração de 3% dessas fibras (NUNPAN; SUWANNACHART; WAYAKANON, 2019).

O FOS em combinação com outras fibras (como pectina, inulina, manitol e maltodextrina) pode aumentar o número de probióticos em leite de soja (YEO; LIONG, 2009). A combinação de FOS com proteína de soro de leite mostrou-se também como uma opção na preservação de lactobacilos (*L. casei* e *L. acidophilus*), mesmo passando pelo processo de liofilização (MASSOUNGA et al., 2018). Liao et al. (2018) conduziram um estudo com quatro tipos de oligossacarídeos, incluindo FOS. As fibras foram empregadas como agentes encapsulantes. Todas as composições aumentaram a viabilidade e conferiram maior resistência à passagem do sistema gastrointestinal mimetizado.

O efeito protetor de um prebiótico parece ser também dependente da cepa

microbiana envolvida. Guedes et al. (2019) identificaram resultados diferenciados, de acordo com a bactéria testada. Contudo, concluíram que o β -glucano é capaz de aumentar a viabilidade de probióticos, inclusive no processo digestivo.

6.7 ATIVIDADE ANTIOXIDANTE

Para os testes utilizou-se o líquido metabólico, desprezando a porção celular da cultura de cada *Lactobacillus* spp. O objetivo foi verificar se alguma das cepas produz compostos com ação antioxidante.

Nenhuma das bactérias testadas apresentou atividade antioxidante relevante. De acordo com Li et al (2012), diferentes comportamentos são observados entre as espécies, havendo de grande à insignificante atividade. Estes autores observaram que a concentração do inóculo pode interferir na quantificação da ação antioxidante das bactérias. A quantidade de células ativas, possivelmente, é diretamente proporcional à intensidade do potencial antioxidante. No nosso trabalho não foram realizadas contagens celulares antes do teste.

No presente estudo, após análise espectrofotométrica, o meio de cultura MRS caldo reagiu positivamente, o que dificultou nossas leituras dos líquidos metabólicos de *L. rhamnosus*, *L. casei* e *L. acidophilus*. Os testes foram repetidos utilizando outro meio de cultura (leite desnatado 10%), contudo, a leitura não pôde ser realizada, devido à precipitação das proteínas que reagiram com os solventes dos métodos de avaliação antioxidante.

6.8 SUCO DE ABACAXI COM POTENCIAL SIMBIÓTICO

O suco de abacaxi elaborado possui valor energético de 56,97 Kcal/100 ml. Os valores médios de obtidos da composição centesimal foram: 90,9% ($\pm 1,0$) de umidade, 1 g ($\pm 0,01$) de açúcares redutores, 5 g ($\pm 0,1$) açúcares não redutores, 6 g ($\pm 0,1$) de açúcares totais, 7,95 g ($\pm 0,012$) de proteínas, 0,03 ($\pm 0,01$) de lipídeos e 0,13 g ($\pm 0,001$) de cinzas.

Baseado nos resultados dos itens 6.2 e 6.5, obtidos *in vitro*, a concentração de fruto-oligossacarídeo utilizada foi de 1,5% para a elaboração do suco. O suco de abacaxi com potencial simbiótico foi avaliado nos dias 01 (dia de sua confecção), 03, 07 e 14. Foi produzido também o suco controle, sem FOS e sem *L. casei*.

6.8.1 Avaliação físico-química do suco

A Tabela 8 apresenta os valores referentes aos parâmetros físico-químicos obtidos durante armazenamento do suco sob refrigeração ($4\pm1^{\circ}\text{C}$). Na mensuração do pH não foi detectada nenhuma diferença significativa no controle. Contudo, observou-se variação estatística entre o dia 01 e o dia 03 no suco com *L. casei* e FOS 1,5%. Comparando o controle com a amostra estudada, houve diferença significativa apenas a partir do sétimo dia de armazenamento, com discreto aumento do pH ao final do décimo quarto dia. Os dados apontam baixa atividade metabólica do microrganismo durante o tempo avaliado (CHAMPAGNE; GARDNER, 2008).

Tabela 9 – Resultado das análises físico-químicas obtidos durante estocagem do suco de abacaxi.

Parâmetro	Dia de armazenamento	Controle	Suco com <i>L. casei</i> e FOS
pH	01	3,54 ($\pm 0,11$) ^{Aa}	3,33 ($\pm 0,10$) ^{Ac}
	03	3,47 ($\pm 0,08$) ^{Aa}	3,51 ($\pm 0,09$) ^{Ab}
	07	3,59 ($\pm 0,06$) ^{Aa}	3,62 ($\pm 0,05$) ^{Ba}
	14	3,52 ($\pm 0,02$) ^{Ba}	3,70 ($\pm 0,01$) ^{Aa}
Acidez total titulável (g. ác. cítrico/100g)	01	0,35 ($\pm 0,01$) ^{Aa}	0,35 ($\pm 0,01$) ^{Aa}
	03	0,35 ($\pm 0,01$) ^{Aa}	0,34 ($\pm 0,01$) ^{Ba}
	07	0,31 ($\pm 0,01$) ^{Ab}	0,29 ($\pm 0,00$) ^{Ab}
	14	0,32 ($\pm 0,01$) ^{Ab}	0,22 ($\pm 0,01$) ^{Bc}
Sólidos solúveis (°Brix)	01	9,31 ($\pm 0,03$) ^{Aa}	9,37 ($\pm 0,03$) ^{Aa}
	03	9,23 ($\pm 0,04$) ^{Aa}	9,17 ($\pm 0,06$) ^{Ab}
	07	9,18 ($\pm 0,02$) ^{Ab}	9,02 ($\pm 0,02$) ^{Bc}
	14	9,07 ($\pm 0,06$) ^{Ab}	8,50 ($\pm 0,02$) ^{Bd}

Valores (médias $\pm$ desvio padrão) com letras maiúsculas diferentes na mesma linha diferem estatisticamente ao nível de 5%. Letras minúsculas diferentes na mesma coluna diferem estatisticamente entre si. Anova One-Way e teste de Tukey.

Quanto à acidez titulável também houve pequena variação ao longo do

tempo na amostra controle. No suco formulado nesta pesquisa, a acidez titulável decresceu, em paralelo ao achado no pH. De acordo com Pereira e Rodrigues (2018), espera-se que os *Lactobacillus* promovam o aumento da acidez do suco, graças à produção de ácido láctico, natural ao seu metabolismo.

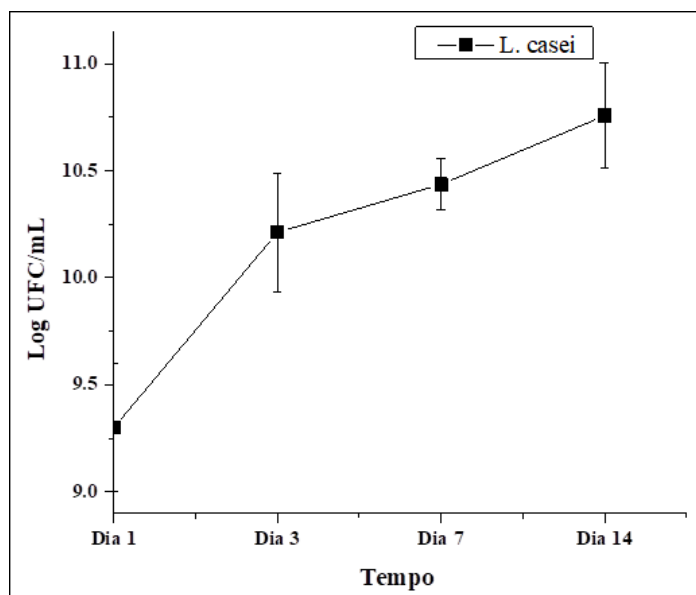
Ao contrário do presente estudo, Zhu et al. (2020) reportam aumento do teor de ácidos detectáveis por titulação e redução do valor de pH em sucos de tomate e laranja contendo *Lactobacillus sanfranciscensis*. O mesmo padrão é reproduzido em suco de maçã contendo *L. plantarum* (ROBERTS et al., 2018). Já Zhang e colaboradores (2020), embora descrevam redução do pH ao longo do período avaliado em seu estudo, também indicam um pequeno aumento de pH ao final de seu teste de 72 h com suco de amora com cocultura de *L. plantarum* e *Saccharomyces cerevisiae*.

O controle apresentou menor alteração do teor de sólidos solúveis totais do que a amostra produzida com *L. casei* e FOS. O suco com potencial simbiótico sofreu redução significativa ($p < 0,05$) a cada tempo avaliado, indicando que houve consumo dos açúcares por parte dos microrganismos. Semelhantes resultados são relatados por Lu et al. (2018) e Dhillon et al. (2021), em suco de carambola e manga, respectivamente.

6.8.2 Viabilidade de *L. casei* no suco

Observa-se na Figura 6 uma multiplicação celular durante os 14 dias de armazenamento. Um total de 9,30 ($\pm 0,30$) log de células viáveis foi adicionado no primeiro dia de avaliação. Ao terceiro dia percebeu-se um aumento significativo do *L. casei*. Nos dias 03, 07 e 14 foram contabilizados 10,21 ($\pm 0,28$), 10,44 ($\pm 0,12$) e 10,76 ($\pm 0,25$) ciclos logarítmicos, respectivamente.

Figura 6 – Contagem de células viáveis de *L. casei* ATCC 334 em 14 dias de armazenamento refrigerado.



Estes achados suportam a redução do teor de sólidos solúveis totais, descrita no item anterior, evidenciando o consumo de açúcares para promover a multiplicação de microrganismos no suco de abacaxi. Contudo, normalmente espera-se que o metabolismo bacteriano impacte proporcionalmente no pH, tornando o ambiente mais ácido.

Trabalhando com suco de tomate, Yoon et al. (2004) também perceberam que a quantidade de açúcares diminuiu ao passo que a contagem de células viáveis de *L. casei* aumentou. Da mesma forma se comportaram *L. paracasei*, *L. helveticus* e *L. rhamnosus* em suco de carambola (Lu et al. 2020): o número de células viáveis inversamente proporcional ao teor de sólidos solúveis durante o seu experimento de 8 dias. O mesmo padrão encontra-se no relato de Fonteles et al. (2012), conduzindo experimento com suco de melão e *L. casei* NRRL B-442.

Como sempre frisado neste estudo, a característica de cepa-dependência não permite extrapolar os resultados para todas as espécies de *Lactobacillus*. Embora citados diferentes estudos acima, onde houve multiplicação bacteriana nos respectivos sucos, há dados que apontam queda no número de células viáveis em diferentes matrizes, como suco de cereja (*L. plantarum*, *L. casei*, *L. paracasei* e *L. rhamnosus*) (RICCI et al., 2019), manga (*L. acidophilus*) (DHILLON et al., 2021), tomate, laranja e maçã (*L. sanfranciscensis*) (ZHU et al., 2020).

O suco de abacaxi suplementado com *L. casei* sofreu redução significativa ($p < 0,05$) na viabilidade celular no trabalho de Ghafari e Ansari (2018). As perdas foram minimizadas com a adição de inulina, que, assim como o FOS de nosso estudo, desempenhou efeito protetor sobre as bactérias. Mesmo com a fibra os autores destacam as perdas estatisticamente significantes aos 28 dias de armazenamento.

De forma similar descrevem Sheehan, Ross e Fitzgerald (2007) com a cepa *L. casei* DN-114 001. Nesse experimento de 12 semanas os autores referiram uma queda lenta, porém crescente, das contagens de células. Outras espécies (*L. salivarius*, *L. paracasei*, *rhamnosus*) testadas nesse mesmo estudo apresentaram mesmo comportamento.

Nguyen et al. (2019) registraram queda no número de *L. acidophilus* após três meses de experimentação em suco de abacaxi, contudo, com valores ainda aceitos por legislação internacional, declarando que esse fruto é um bom substrato para veículo de probióticos.

Pesquisando a viabilidade de *L. plantarum* e *L. fermentum*, Hossain et al. (2020) notaram padrão parecido aos já aqui descritos. Segundo estes autores, entre a cultura celular inicial e o sétimo dia, houve aumento expressivo na contagem celular. Porém a partir da segunda semana a viabilidade bacteriana é reduzida. Os valores encontrados também estão acima do recomendado pela OMS, caracterizando o suco como probiótico.

Semelhante à presente pesquisa, os probióticos se multiplicaram no suco de abacaxi elaborado por Islam e colaboradores (2021), com ganho de 0,68 logs. Os pesquisadores observaram variação na viabilidade celular após digestão *in vitro*, com redução nos dias avaliados.

6.8.3 Viabilidade de *L. casei* no suco em simulação do trato gastrointestinal

Para que o microrganismo consiga desempenhar as funções probióticas no sítio-alvo, ou seja, o intestino grosso, é necessário que o mesmo sobreviva às condições adversas do processo de digestão, incluindo as variações de pH e as enzimas digestivas (VEMURI et al., 2018).

Além da contagem celular, neste trabalho houve a preocupação de se

verificar a sobrevivência das células de *Lactobacillus casei* ATCC 334 à digestão *in vitro* também durante a vida de prateleira do suco. Isso permite fechar a conclusão sobre a possibilidade de emprego do produto como um alimento funcional. Os resultados estão elencados na Tabela 9.

Tabela 10 – Viabilidade do *L. casei* durante simulação do trato gastrointestinal ao longo do armazenamento do suco de abacaxi com potencial simbiótico.

Armazenamento	Tempo (min)			
	0	60	120	240
	log UFC/ml			
Dia 0	9,30 ($\pm 0,30$) ^{Ab}	7,51 ($\pm 0,02$) ^{Ba}	7,54 ($\pm 0,05$) ^{Ba}	0,00 ($\pm 0,00$) ^{Cb}
Dia 3	10,21 ($\pm 0,28$) ^{Aa}	5,54 ($\pm 0,28$) ^{Bb}	6,37 ($\pm 0,14$) ^{Bb}	5,32 ($\pm 0,73$) ^{Ba}
Dia 7	10,44 ($\pm 0,12$) ^{Aa}	4,33 ($\pm 0,58$) ^{Bc}	4,65 ($\pm 0,75$) ^{Bc}	0,00 ($\pm 0,00$) ^{Cb}
Dia 14	10,76 ($\pm 0,25$) ^{Aa}	6,26 ($\pm 0,24$) ^{Cb}	6,67 ($\pm 0,17$) ^{Ba}	0,00 ($\pm 0,00$) ^{Db}

Valores (médias $\pm$ desvio padrão) com letras maiúsculas diferentes na mesma linha diferem estatisticamente ao nível de 5%. Letras minúsculas diferentes na mesma coluna diferem estatisticamente entre si. Anova One-Way e teste de Tukey.

Embora tenha ocorrido multiplicação do *L. casei* no suco de abacaxi adicionado de FOS durante todo o período de armazenamento refrigerado, percebeu-se que houve dano celular expressivo, a ponto de comprometer sua resistência à digestão *in vitro*.

Conforme registro da Tabela 9, no primeiro dia de análise (2h após a inclusão da suspensão bacteriana no suco), a partir dos 60 minutos de simulação gastrointestinal já se notou redução estatisticamente significativa ($p < 0,05$), quando comparada à contagem inicial. Na etapa correspondente à fase intestinal da digestão, não houve crescimento de nenhuma colônia, indicando a morte bacteriana aos 240 minutos de teste.

No terceiro dia de armazenamento, acompanhado do consumo de sólidos solúveis e do aumento do número de células viáveis, ocorreu crescimento quantitativo significativo. Entretanto, esse aumento de bactérias viáveis não

garantiu resultados satisfatórios ao final da simulação. Ainda na fase gástrica contabilizou-se perda de 4,67 logs de células e apenas 5,32 ($\pm 0,73$) logs foram recuperados ao final do experimento. A partir do Dia 07 não foi mais possível detectar alguma formação de colônia na etapa correspondente à absorção intestinal.

À primeira vista, focando apenas nos números da viabilidade, seria possível afirmar que o suco de abacaxi formulado, adicionado de 10% de *L. casei* ATCC 334 e 1,5% de FOS, é um excelente produto simbiótico. Todavia, tal alegação só poderia encontrar respaldo científico se as bactérias chegassem em quantidade viável ao intestino do consumidor (VEMURI et al., 2018).

Padrão similar ao descrito nesta pesquisa é descrito por Campos et al. (2018) em suco de abacaxi com juçara. Os autores descrevem um aumento na viabilidade de seu suco fermentado por *L. rhamnosus* GG, mas com baixa recuperação após simulação da digestão *in vitro*.

O mesmo ocorre com *L. casei* BGP93, também em blend composto de juçara, banana e morango: alta viabilidade durante o armazenamento, porém contagens inferiores à quantidade mínima capaz de exercer ação probiótica, após passar pelas condições gastrointestinais *in vitro* (RIBEIRO et al., 2020).

Já o *L. acidophilus* NIAI L-54 presente em blend de abacaxi com soro de leite permaneceu com excelente preservação na investigação de Islam et al. (2021) em ambiente gastrointestinal simulado. O mesmo descreve Ribeiro e colaboradores (2020) com *L. acidophilus* NRRL B-4495 em suco de cajá, bem como Farias et al. (2016) sobre *L. rhamnosus* ATCC 7469 em suco de maracujá fermentado.

Zhu et al. (2020) utilizaram *L. sanfranciscensis* em três diferentes sucos de frutas (maçã, laranja e tomate) e observaram que o comportamento da bactéria diferiu em relação à composição da bebida. Os autores constataram que o suco de laranja promoveu maior viabilidade, entretanto, assim como na presente pesquisa, o microrganismo não apresentou taxa de sobrevivência satisfatória, tanto na etapa gástrica como na entérica.

Ao longo de 28 dias, Cunha Júnior et al. (2021) acompanharam o desempenho de *L. casei* 01® em bebida fermentada de castanha-do-Brasil adicionada de inulina. Embora a viabilidade do microrganismo tenha permanecido

elevada, os dados da simulação gastrointestinal apontam uma acentuada perda numérica.

A faixa de pH ótima para o *L. casei* varia em torno de 4,0 a 5,5, com diversas espécies que se desenvolvem melhor em ambiente neutrófilo (VAN DE GUCHTE et al., 2002). O suco de abacaxi elaborado nessa investigação possuiu uma média de 3,53. O ambiente ácido pode ter favorecido a autólise das células microbianas, pois após a exposição ao suco observou-se redução na resistência à digestão *in vitro* (SHEEHAN; ROSS; FITZGERALD, 2007). Outro fator a ser considerado é o conteúdo de compostos fenólicos do abacaxi com ação antimicrobiana, que podem ter fragilizado a membrana celular do lactobacilo (ISLAM et al., 2021). Ranadheera et al. (2010) indica que há necessidade de se estudar a interação do microrganismo selecionado com a matriz alimentar em que ele pretende ser veiculado.

De acordo com Lorea e Valdez (2001), um ambiente acidificado proporciona maior resistência às células de probióticos. Contudo, esta afirmativa não pode ser aplicada a todas as espécies, visto que cada cepa possui propriedades e comportamentos particulares.

A literatura aponta que os ácidos presentes na matriz alimentar (neste caso, o suco de abacaxi) podem penetrar a membrana celular passivamente, se dissociando em prótons e acumulando-se no interior da célula. Esse acúmulo fomenta a redução do pH citoplasmático, prejudicando proteínas e até mesmo o DNA da bactéria (VAN DE GUCHTE et al., 2002). Mas de acordo com Manthipa e Thantsha (2015) é possível robustecer as células através de preparo *in vitro*, que consiste em um estresse pré-adaptativo às condições gastrointestinais.

Associado ao estresse ácido, a pepsina tem a capacidade de quebrar as cadeias peptídicas entre os aminoácidos presentes na membrana celular dos probióticos, levando à sua ruptura (CHAMPAGNE; GARNER et al., 2008; ZHU et al., 2020).

Conforme mencionado anteriormente, as bactérias ácido-láticas, em sua maioria, têm tropismo por ambientes anaeróbios. Dave e Shah (1997) detectaram maior viabilidade de *L. acidophilus* em iogurte com menor concentração de oxigênio dissolvido. Durante a moagem do fruto na fabricação do suco pode ocorrer incorporação de oxigênio. Em determinadas atmosferas de O₂ é possível observar

alterações metabólicas nesses microrganismos, inclusive até mesmo modificações em seu formato (TALWALKAR; KAILASAPATHY, 2003).

Uma forma de possibilitar o aumento da recuperação das células após simulação gastrointestinal é através da fermentação do suco. Contudo, o uso da fermentação implica em alteração das características organolépticas, que pode comprometer a aceitabilidade por parte do consumidor (ANDRADE et al., 2019).

Embora sejam conhecidos efeitos benéficos provocados por fragmentos de células mortas, células inativas e seus metabólitos (CUNHA JÚNIOR et al., 2021), é preciso lançar mão de ferramentas que propiciem a viabilidade do *L. casei* em digestão simulada ao longo de todo o período de armazenamento do suco de abacaxi adicionado de fruto-oligossacarídeo. A encapsulação e a co-encapsulação com o FOS (isto é, encapsulação da bactéria + a fibra) podem ser alternativas viáveis para a indústria. A suplementação com vitaminas e a exposição a estresse pré-adaptativo também são possibilidades a serem exploradas (ŽUNTAR et al., 2020)

Para a elaboração de uma bebida simbiótica, com efeitos funcionais ao organismo hospedeiro, é necessário encontrar uma cepa adequada, resistente ao processamento do suco, à sua composição à vida de prateleira e ao trânsito gastrointestinal. Embora não abordado neste trabalho, é preciso que haja também testes para avaliação dos atributos sensoriais de qualidade antes de ser lançado ao mercado. Os dados obtidos no presente estudo são de grande importância científica e industrial, corroborando que as características de funcionalidade são cepa-dependentes. Dessa forma são criadas oportunidades para mais pesquisas que visem garantir o fornecimento adequado de probióticos aos consumidores.

7 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Dos três microrganismos considerados neste estudo a cepa de *Lactobacillus casei* ATCC 334 apresentou melhor viabilidade na presença de 1,5% de fruto-oligossacarídeo, inclusive em ambiente gastrointestinal simulado. Conforme observado, a associação com o prebiótico pode melhorar o desempenho do microrganismo *in vitro*.

Não se verificou atividade antimicrobiana nem antioxidante em nenhuma das cepas avaliadas, contudo, todas as espécies são capazes de produzir amilase, protease, lipase e celulase, que são enzimas de interesse industrial e de grande valor econômico. De forma geral, todas as bactérias são seguras à saúde humana nos parâmetros testados.

O suco de abacaxi é um substrato que favorece a multiplicação do *L. casei*, mas este crescimento numérico não é acompanhado de resistência ao trato gastrointestinal. Compostos antimicrobianos intrínsecos da fruta, teor de oxigênio ou pH ácido fragilizam a cepa e levam à sua morte na fase entérica. Faz-se necessário aprofundamento nesta questão, a fim de viabilizar a comercialização do suco com potencial simbiótico.

Com os dados coletados dentro dessa linha de pesquisa foi possível a publicação do manuscrito intitulado “Viabilities of *Lactobacillus rhamnosus* ASCC 290 and *Lactobacillus casei* ATCC 334 (in free form or encapsulated with calcium alginate-chitosan) in yellow mombin ice cream” na revista LWT (Apêndice A). Também houve divulgação através do capítulo “Alimentos simbióticos: uso da coencapsulação como forma de veiculação de probióticos e prebióticos”, no livro Avanços em Ciência e Tecnologia de Alimentos (Apêndice B). Outros dois artigos seguem em produção.

REFERÊNCIAS

- ABDEL-HAMID, M. et al. The biological activity of fermented milk produced by *Lactobacillus casei* ATCC 393 during cold storage. **International Dairy Journal**, v. 19, p. 1-8, 2019. DOI: 10.1016/j.idairyj.2018.12.007
- ABEER MOHAMMED, A. B.; HEGAZY, A.E.; SALAH, A. Predigested high-fat meats based on *Lactobacillus fermentum* lipase enzyme immobilized on silver-alginate nanoparticle matrix. **Applied Nanoscience**, 2021.
- ABDOLLAHZADEH, S.M. et al. Development of *Lactobacillus acidophilus*-fermented milk fortified with date extract. **LWT**, v. 98, p. 577-582, 2018. DOI: 10.1016/j.lwt.2018.09.042
- ACEVEDO-MARTÍNEZ, E. et al. Evaluation of viability of probiotic bacteria in mango (*Mangifera indica* L. Cv. "Tommy Atkins") beverage. **DYNA**, v. 85, n. 207, p. 84-92, 2018.
- ADRIANA, D.A.B.; BARLETA, C.V.N. Alimento Funcional: Uma Nova Abordagem Terapêutica das Dislipidemias como Prevenção da Doença Aterosclerótica. **Cadernos UniFOA**, v.2, n.3, 2007.
- AGÜERO, L. et al. Alginate microparticles as oral colon drug delivery device: A review. **Carbohydrate Polymers**, v. 168, p. 32-43, 2017.
- AİKPE, J. et al. Preventive Effects of Ananas comosus Juice on Obesity Risk Factors in Female Wistar Rats. **Open Journal of Applied Sciences**, v. 10, n. 08, p. 534-542, 2020.
- AKIN-OSANAIYE, B.C.; AZEEZ, B. T; OLOBAYOTAN, I. W. Evaluation of Invertase and Amylase Activities of Lactic Acid Bacteria Isolated from 'Pupuru' (An Indigenous African Fermented Cassava Staple Food). **Asian Journal of Research in Biochemistry**, v. 5, n. 3, 2019.
- ALBUQUERQUE, M. et al. Influence of passion fruit by-product and fructooligosaccharides on the viability of *Streptococcus thermophilus* TH-4 and *Lactobacillus rhamnosus* LGG in folate bio-enriched fermented soy products and their effect on probiotic survival and folate bio-accessibility under in vitro simulated gastrointestinal conditions. **International Journal of Food Microbiology**, v. 292, p. 126-136, 2019.
- ALLEY, M.C. et al. Feasibility of drug screening with panels of human tumor cell lines using a microculture tetrazolium assay. **Cancer Research**, v. 48, n. 3, 1988.
- ALLONSIUS, C.N. Interplay between *Lactobacillus rhamnosus* GG and *Candida* and the involvement of exopolysaccharides. **Microbial Biotechnology**, v. 10, n. 6, 2017.
- AL-SHERAJI, S. et al. Prebiotics as functional foods: A review. **Journal of**

Functional Foods, v. 5, n. 4, p. 1542-1553, 2013.

AMERICAN PUBLIC HEALTH ASSOCIATION (APHA). **Compendium of methods for the microbiological examination of foods**. 4th ed. Washington: APHA, 2001.

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**, v. 32, 2019. doi:10.1016/j.fbio.2019.100470

ANILA, K.; KUNZES, A. BHALLA, T.C. In Vitro Cholesterol Assimilation and Functional Enzymatic Activities of Putative Probiotic *Lactobacillus* sp. Isolated from Fermented Foods/ Beverages of North West India. **Journal of Nutrition & Food Sciences**, v. 06, n. 02, 2016.

ANNUK, H. et al. Characterization of intestinal lactobacilli as putative probiotic candidates. **Journal of Applied Microbiology**, v. 94, n. 3, p. 403-12, 2003. doi: 10.1046/j.1365-2672.2003.01847.x.

ARYA, R.; GUNASHREE, B.S. Screening of gluten hydrolyzing strains for food applications. **Journal of Food Processing and Preservation**, 2021.

ARYANTINI, N. et al. In vitrosafety assessments and antimicrobial activities of *Lactobacillus rhamnosus* strains isolated from a fermented mare's milk. **Animal Science Journal**, v. 88, n. 3, p. 517-525, 2016.

ASHAOLU, T.J. Immune boosting functional foods and their mechanisms: A critical evaluation of probiotics and prebiotics. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 130, 2020. DOI: 10.1016/j.biopha.2020.110625

ASHRAF, R.; SHAH, N. Selective and differential enumerations of *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, *Streptococcus thermophilus*, *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus casei* and *Bifidobacterium* spp. in yoghurt — A review. **International Journal of Food Microbiology**, v. 149, n. 3, p. 194-208, 2011.

ASKARI, G. et al. The effect of symbiotic supplementation on liver enzymes, c-reactive protein and ultrasound findings in patients with non-alcoholic fatty liver disease: A clinical trial. **International Journal of Preventive Medicine**, v. 7, n. 1, p. 59, 2016.

ASPRI, M.; PAPADEMAS, P.; TSALTAS, D. Review on Non-Dairy Probiotics and Their Use in Non-Dairy Based Products. **Fermentation**, v. 6, n. 1, p. 30, 2020.

BABASHAHI, M. Effects of Probiotic Soy Milk Fermented by *Lactobacillus plantarum* A7 (KC 355240) added with *Cuminum Cyminum* Essential Oil on Fasting Blood Glucose Levels, Serum Lipid Profile and Body Weight in Diabetic Wistar Rats. **International Journal of Preventive Medicine**, v. 11, n. 8, 2020.

BAGHBANI-ARANI, F.; ASGARY, V.; HASHEMI, A. Cell-free extracts of

Lactobacillus acidophilus and Lactobacillus delbrueckii display antiproliferative and antioxidant activities against HT-29 cell line. **Nutrition and Cancer**, p. 1-10, 2019.

BAI, M. Probiotic Lactobacillus casei Zhang improved the properties of stirred yogurt. **Food Bioscience**, v. 37, 2020. DOI: 10.1016/j.fbio.2020.100718

BAKR, S. A. The potential applications of probiotics on dairy and non-dairy foods focusing on viability during storage. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology** (in press), 2015.

BALDASSARRE, M. Probiotic Genera/Species Identification Is Insufficient for Evidence-Based Medicine. **American Journal of Gastroenterology**, v. 113, n. 10, p. 1561, 2018.

BARTHELS, F.; MEYER, F.; PIETROWSKY, R. Orthorexic and restrained eating behaviour in vegans, vegetarians, and individuals on a diet. **Eating and Weight Disorders - Studies on Anorexia, Bulimia and Obesity**, v. 23, n. 2, p. 159-166, 2018.

BENVENUTTI, L.; ZIELINSKI, A.A.F.; FERREIRA, S.R.S. Jaboticaba (Myrtaceae cauliflora) fruit and its by-products: Alternative sources for new foods and functional components. **Trends in Food Science & Technology**, v. 112, p. 118-136, 2021.

BEREZOVSKAYA, Y. et al. Biotic nutritional components in baby formula: possible solution for infantile colic management. **Functional Foods in Health and Disease**, v. 10, n. 9, 2020. DOI: 10.31989/ffhd.v10i9.737

BERISTAIN-BAUZA, S.C. et al. Antimicrobial activity and physical properties of protein films added with cell-free supernatant of Lactobacillus rhamnosus. **Food Control**, v.62, p. 44-51, 2016.

BERNAL-CASTRO, C.; DÍAZ-MORENO, C.; GUTIÉRREZ-CORTÉS, C. Inclusion of prebiotics on the viability of a commercial Lactobacillus casei subsp. rhamnosus culture in a tropical fruit beverage. **Journal of Food Science and Technology**, v. 56, n. 2, p. 987-994, 2019.

BHARATHI, D.; RAJALAKSHMI, G. Microbial lipases: An overview of screening, production and purification. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 22, p. 101368, nov. 2019.

BIGLIARDI, B.; GALATI, F. Innovation trends in the food industry: The case of functional foods. **Trends in Food Science & Technology**, v.31, n.2, p.118-129. 2013.

BIS-SOUZA, C.V. et al. Applicability of potentially probiotic Lactobacillus casei in low-fat Italian type salami with added fructooligosaccharides: in vitro screening and technological evaluation. **Meat Science**, v. 168, 2020.

BJAJA, P.; MAHAJAN, R. Cellulase and xylanase synergism in industrial

biotechnology. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 103, p. pages8711–8724, 2019.

BLAIOTTA, G. et al. Effect of chestnut extract and chestnut fiber on viability of potential probiotic *Lactobacillus* strains under gastrointestinal tract conditions. **Food Microbiology**, v. 36, n. 2, p. 161-169, 2013.

BLAUT, M. Relationship of prebiotics and food to intestinal microflora. **European Journal of Nutrition**, v. 41, p. 11-16, 2002.

BLOIS, M. Antioxidant Determinations by the Use of a Stable Free Radical. **Nature**, v. 181, n. 4617, p. 1199-1200, 1958.

BOGER, M.C.L et al. Cross-Feeding among Probiotic Bacterial Strains on Prebiotic Inulin Involves the Extracellular exo-Inulinase of *Lactobacillus paracasei* Strain W20. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 84, n., 21, 2018. doi.org/10.1128/AEM.01539-18

BOUHNİK, Y. et al. Four-week short chain fructo-oligosaccharides ingestion leads to increasing fecal bifidobacteria and cholesterol excretion in healthy elderly volunteers. **Nutrition Journal**, v. 6, n. 1, 2007.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. RDC nº 12, de 2 de janeiro de 2001. **Regulamento técnico sobre padrões microbiológicos para alimentos**. Disponível em: http://www.anvisa.gov.br/legis/resol/12_01rdc.htm. Acesso em: 21 de setembro de 2016.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. RDC nº 2, de 7 de janeiro de 2002. **Regulamento Técnico de Substâncias Bioativas e Probióticos Isolados com alegação de propriedades funcional e/ou de saúde**. Disponível em: http://portal.anvisa.gov.br/wps/wcm/connect/1c77370047457bcc888dc3fbc4c6735/RDC_02_2002.pdf?MOD=AJPERES. Acesso em: 20 de setembro de 2016.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa Nº 12, de 4 de setembro de 2003. **Regulamento técnico para fixação dos padrões de identidade e qualidade gerais para suco tropical**. Disponível em: http://www.sucodeuvaldo.com.br/legislacao/instrucao_normativa_n12_de_04_d_e_setembro_de_2003_suco_tropical.pdf

BURITI, F.; CASTRO, I.; SAAD, S. Viability of *Lactobacillus acidophilus* in synbiotic guava mousses and its survival under in vitro simulated gastrointestinal conditions. **International Journal of Food Microbiology**, v. 137, n. 2-3, p. 121-129, 2010.

BURITI, F.C.A; SAAD, S.M.I. Bactérias do grupo *Lactobacillus casei*: caracterização, viabilidade como probióticos em alimentos e sua importância para a saúde humana. **Archivos Latinoamericanos de Nutrición**, v. 57, n. 4. 2007.

BUTEL, M.J. Probiotics, gut microbiota and health. **Médecine et Maladies**

Infectieuses, v. 44, n.1, p. 1-8. 2014.

CAGGIA, C.; ANGELIS, M.; PITTINO, I.; PINO, A.; RANDAZZO, C.L. Probiotic features of *Lactobacillus* strains isolated from Ragusano and Pecorino Siciliano cheeses. **Food Microbiology**, v. 50, p. 109-117, 2015.

CAMINERO et al.. Lactobacilli Degrade Wheat Amylase Trypsin Inhibitors to Reduce Intestinal Dysfunction Induced by Immunogenic Wheat Proteins. **Gastroenterology**, v. 156, n. 8, p. 2266-2280. doi: 10.1053/j.gastro.2019.02.028.

CAMPOS, R.C.A.B. et al. In vitro and in vivo resistance of *Lactobacillus rhamnosus* GG carried by a mixed pineapple (*Ananas comosus* L. Merrill) and jussara (*Euterpe edulis* Martius) juice to the gastrointestinal tract. **Food Research International**, v. 116, p. 1247-1257, 2018. doi:10.1016/j.foodres.2018.10.012

CEASA. Calendário de Comercialização 2018 – Centro de Abastecimento e Logística de Pernambuco. Recife, PE: Secretaria de Cultura e Reforma Agrária. Disponível em:
<<http://www.ceasape.org.br/assets/repositorio/calendario/15313344395724-15247526488611calendario2018.pdf>> acesso em 06 mar. 2020.

CEASA. Calendário de Comercialização 2018 – Centro de Abastecimento e Logística de Pernambuco. Recife, PE: Secretaria de Cultura e Reforma Agrária. Disponível em:
<<http://www.ceasape.org.br/assets/repositorio/calendario/15313344395724-15247526488611calendario2018.pdf>> acesso em 06 mar. 2020.

CHANDRA, P. et al. Microbial lipases and their industrial applications: a comprehensive review. **Microbial Cell Factories**, v. 19, n. 1, 26 ago. 2020.

CHARTERIS, W.P. et al. Antibiotic susceptibility of potentially probiotic *Lactobacillus* species. **Journal of Food Protection**, v.6, p. 1636-1643, 1998.

CHAWAFAMBIRA, A. et al. The potential of *Uapaca kirkiana* fruit jam for the delivery of *Lactobacillus rhamnosus* yoba as a probiotic food. **African Journal of Food, Agriculture, Nutrition and Development**, v. 20, n. 4, 2020.

CHEN, G.; LI, C.; CHEN, K. Fructooligosaccharides. **Studies in Natural Products Chemistry**, p. 209-229, 2016.

CHEN, R. et al. Comparative Evaluation of the Antioxidant Capacities, Organic Acids, and Volatiles of Papaya Juices Fermented by *Lactobacillus acidophilus* and *Lactobacillus plantarum*. **Journal of Food Quality**, v. 2018, p. 1-12, 2018.

CHINEDU, E. et al. Preliminary assessment of the antiproliferative potential of *Ananas comosus* (pineapple) fruit juice. **Journal of Hermed Pharmacology**, v. 5, n. 2, p. 50-53, 2016.

CHOUDHARY, R. Isolation and screening of lipase producing bacteria from oil mill effluent. **Indian Journal of Scientific Research**, v. 13, n. 2, p. 192-194, 2017.

CHOWDHURY, T.; ISLAM, S. Isolation, Identification and Determination of Probiotic potential of Lactic Acid Bacteria from Local Curd. **International Journal of Scientific & Engineering Research**, v. 7, n. 4, 2016.

CHRISTIDES, T.; GANIS, J.; SHARP, P. In vitro assessment of iron availability from commercial Young Child Formulae supplemented with prebiotics. **European Journal of Nutrition**, v. 57, n. 2, p. 669-678, 2016.

CLINICAL LABORATORY STANDARD INSTITUTE (Pennsylvania). **Performance standards for antimicrobial susceptibility testing**. 26th ed. Wayne, 2016. CLSI supplement M100S.

CRISTOFORI, F. et al. Bacterial-Based Strategies to Hydrolyze Gluten Peptides and Protect Intestinal Mucosa. **Frontiers in Microbiology**, 2020. DOI: doi.org/10.3389/fimmu.2020.567801.

CUELLO-GARCIA, C. et al. Prebiotics for the prevention of allergies: A systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials. **Clinical and Experimental Allergy**, v.47, n.11, p.1468-1477, 2017.

CUMMINGS, J.H. et al. Short chain fatty acids in human large intestine, portal, hepatic and venous blood. **Gut**, v.28, n.10, p. 1221-1227, 1987.

DAS, D.; BHAT, R.; SELVARAJ, R. Review of inulinase production using solid-state fermentation. **Annals of Microbiology**, v. 69, p. 201–209, 2019. doi.org/10.1007/s13213-019-1436-5

DAS, G.; JOSEPH, M.M.; IYER, P. Antimicrobial activity of fermented and non-fermented Oats (*Avena sativa*) against selected food borne pathogens. **International Journal of Home Science**, v. 3, n. 1, p.280-2, 2017.

DAUD, N. et al. The impact of oligofructose on stimulation of gut hormones, appetite regulation and adiposity. **Obesity**, v. 22, n. 6, p. 1430-1438, 2014.

DAVE, R.I.; Shah, N.P. Viability of yoghurt and probiotic bacteria in yoghurts made from commercial starter cultures. **International Dairy Journal**, v. 7, p. 31-41, 1997.

DESHAWARE, S.; GUPTA, S.; SINGHAL, R.; VARIYAR, P.S. Influence of different pasteurization techniques on antidiabetic, antioxidant and sensory quality of debittered bitter melon juice during storage. **Food Chemistry**, v. 285, n.1, p. 156-162, 2019. doi: 10.1016/j.foodchem.2019.01.140

DE VERAS, B.O. Screening of protease, cellulase, amylase and xylanase from the salt-tolerant and thermostable marine *Bacillus subtilis* strain SR60. **F1000 Research**, v. 7, 2018.

DE VRESE, M.; SCHREZENMEIR, J. Probiotics, Prebiotics, and Synbiotics. In: STAHL, U. et al. Food Biotechnology. Advances in Biochemical, Engineering/Biotechnology. Berlin: Springer, 2008, p. 1-66.

DEC, M. et al. Screening of Lactobacillus strains of domestic goose origin against bacterial poultry pathogens for use as probiotics. **Poultry Science**, v. 93, n. 10, p. 2464-2472, 2014.

DELGADO, G.C.; TAMASHIRO, W. Role of prebiotics in regulation of microbiota and prevention of obesity. *Food Research International*, v. 113, p. 183-188, 2018.

DHILLON, H.S. et al. Preparation of Lactobacillus acidophilus enriched probiotic mango juice. **Journal of Environmental Biology**, v. 42, 371-378, 2021.

DHINGRA, D.; MICHAEL, M. HRADESH et al. Dietary fibre in foods: a review. **Journal of Food Science and Technology**, v. 49, n. 3, p. 255-266, 2011.

DINCER, E.; KIVANC, M. Characterization of Lactobacillus plantarum strains isolated from Turkish pastırma and possibility to use of food industry. **Food Science and Technology**, v. 40, n. 2, p. 498-507, 2020.

DOMINGUEZ, A.L. et al., An Overview of the Recent Developments on Fructooligosaccharide Production and Applications. **Food and Bioprocess Technology**, v.7, n.2, p 324-337, 2014.

EDALATI, E.; SANEEI, B.; ALIZADEH, M. et al. Isolation of probiotic bacteria from raw camel's milk and their antagonistic effects on two bacteria causing food poisoning. **New Microbes and New Infections**, v. 27, p. 64-68, 2019.

ELEAN, M. et al. New immunobiotics from highly proteolytic Lactobacillus delbrueckii strains: their impact on intestinal antiviral innate immune response. **Beneficial Microbes**, v.11, n. 4, 2019. DOI: doi.org/10.3920/BM2019.0198

EMBRAPA. **Fruticultura Tropical: potenciais riscos e seus impactos**. Cruz das Almas, BA: Embrapa Mandioca e Fruticultura, 2019. Disponível em: <<https://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/item/197322/1/Documento232-AureaGerum-Ainfo.pdf>>

EMBRAPA. **Produção brasileira de abacaxi em 2018**. Brasília, DF: Embrapa Informação Tecnológica, 2019. Disponível em: <http://www.cnpmf.embrapa.br/Base_de_Dados/index_pdf/dados/brasil/abacaxi/b1_abacaxi.pdf> Acesso em 06 mar. 2020.

ERTEM, H.; ÇAKMAKÇI, S. Shelf life and quality of probiotic yogurt produced with Lactobacillus acidophilus and Gobdin. **International Journal of Food Science and Technology**, 2017. DOI: doi.org/10.1111/ijfs.13653

FACHRIAL, E. et al. Inulinase Activity of Thermophilic Bacteria isolated from Hot Springs of Penen Village, North Sumatera, Indonesia. **IOP Publishing**, v. 406, 2019. doi:10.1088/1755-1315/406/1/012012

FAGHFOORI, Z. et al. The Investigation of the Diversity of Lactobacilli Spp. and Assessment Their Some Probiotic Properties in Traditional Dairy Products in East Azerbaijan Province in Iran. **Iranian Journal of Pharmaceutical Research**, v. 16,

n. 4, p. 1538–1545, 2017.

FAO/WHO. Guidelines for the evaluation of probiotics in food. **Report of a joint FAO/WHO working group on drafting guidelines for the evaluation of probiotics in food**. London, Ontario, Canadá, 2002.

FARIAS, N.; SOARES, N.; GOUVEIA, E. Enhancement of the viability of *Lactobacillus rhamnosus* ATCC 7469 in passion fruit juice: Application of a central composite rotatable design. **LWT**, v. 71, p. 149-154, 2016.
doi.org/10.1016/j.lwt.2016.03.014

FARIAS, T. et al. Viabilities of *Lactobacillus rhamnosus* ASCC 290 and *Lactobacillus casei* ATCC 334 (in free form or encapsulated with calcium alginate-chitosan) in yellow mombin ice cream. **LWT**, v. 100, p. 391-396, 2019.

FAROOQ, M.A. et al. Biosynthesis and industrial applications of α -amylase: a review. **Archives of Microbiology**, v. 203, n. 4, p. 1281-1292, 2021.

FONTELES, T. et al. Optimization of the Fermentation of Cantaloupe Juice by *Lactobacillus casei* NRRL B-442. **Food and Bioprocess Technology**, v. 5, n. 7, 2011.

FrancaVilla, R. et al. Selected Probiotic *Lactobacilli* Have the Capacity To Hydrolyze Gluten Peptides during Simulated Gastrointestinal Digestion. **Applied and Environmental Microbiology**, 2017. DOI: doi.org/10.1128/AEM.00376-17

GANDOMI, H. et al. Effect of chitosan-alginate encapsulation with inulin on survival of *Lactobacillus rhamnosus* GG during apple juice storage and under simulated gastrointestinal conditions. **LWT – Food Science and Technology**, v.69, p. 365-371, 2016.

GARCÍA-CEJA, A. et al. Viability during refrigerated storage in selected food products and during simulated gastrointestinal conditions of individual and combined *Lactobacilli* encapsulated in alginate or alginate-chitosan. **Food Science and Technology**, v.63, n. 1, p. 482-489, 2015.

GERMEC, M. et al. Medium optimization and kinetic modeling for the production of *Aspergillus niger* inulinase. **Bioprocess and Biosystems Engineering**, v. 43, p. 217–232, 2020.

GHAFAARI, S.; ANSARI, S. Microbial viability, physico-chemical properties and sensory evaluation of pineapple juice enriched with *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus rhamnosus* and inulin during refrigerated storage. **Journal of Food Measurement and Characterization**, v. 12, p. 2927–2935, 2018.
doi.org/10.1007/s11694-018-9908-z

GILLILAND, S.; NELSON, C.; MAXWELL, C. Assimilation of cholesterol by *Lactobacillus acidophilus*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 49, n. 2, p. 377-381, 1985.

GIRI, S.S. Use of a Potential Probiotic, *Lactobacillus casei* L4, in the Preparation of Fermented Coconut Water Beverage. **Frontiers in Microbiology**, 2018. DOI: 10.3389/fmicb.2018.01976

GOLEZAR, S. Ananas comosus Effect on Perineal Pain and Wound Healing After Episiotomy: A Randomized Double-Blind Placebo-Controlled Clinical Trial. **Iranian Red Crescent Medical Journal**, v. 18, n. 3, 2016.

GRAND VIEW RESEARCH. Probiotics Market Size, Share & Trends Analysis Report By Product (Food & Beverages, Dietary Supplements), By Ingredient (Bacteria, Yeast), By End Use (Human, Animal), By Distribution Channel, And Segment Forecasts, 2021 – 2028. Disponível em: <
<https://www.grandviewresearch.com/industry-analysis/probiotics-market>>

GREENHALGH, K. et al. Integrated in Vitro and in Silico Modelling Delineates the Molecular Effects of a Symbiotic Regimen on Colorectal Cancer-Derived Cells. **SSRN Electronic Journal**, 2018.

GUAN, C. Isolation of novel *Lactobacillus* with lipolytic activity from the vinasse and their preliminary potential using as probiotics. *AMB Express*, v. 10, n. 91, 2020.

GUADIX, A.; CAMACHO, F.; GUADIX, E. M. Production of whey protein hydrolysates with reduced allergenicity in a stable membrane reactor. n, v. 72, n. 4, p. 398–405, fev. 2006.

GUDYNAITE-SAVITCH, L.; WHITE. T.C. Fungal Biotechnology for Industrial Enzyme Production: Focus on (Hemi)cellulose Production Strategies, Advances and Challenges. *In: Gene Expression Systems in Fungi: Advancements and Applications*. Fungal biology. Springer, p. 393-440, 2016.

GUEDES, J.S. et al. Protective effects of β -glucan extracted from spent brewer yeast during freeze-drying, storage and exposure to simulated gastrointestinal conditions of probiotic lactobacilli. **LWT**, v. 116, p. 108496, 2019.

GUERGOLLETO, K. et al. Survival of *Lactobacillus casei* (LC-1) adhered to prebiotic vegetal fibers. **Innovative Food Science & Emerging Technologies**, v. 11, n. 2, p. 415-421, 2010.

GÜRLER, H.N. et al. The inhibition effect of phenol on the production of *Aspergillus niger* inulinase and its modeling. **Journal of Food Processing and Preservation**, 2020. DOI: doi.org/10.1111/jfpp.14522

HABA, E. et al. Isolation of lipase-secreting bacteria by deploying used frying oil as selective substrate. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 26, n. 1, 40-44, 2000. doi.org/10.1016/S0141-0229(99)00125-8

HALIM, N.A.A. et al. In vitro shoot regeneration and analysis of biochemical, antioxidant and anticancer properties of *Ananas comosus* var. MD2. **Malaysian Journal of Fundamental and Applied Sciences**, v. 14, n.2, p. 263-268, 2018.

HANKIN, L.; ANAGNOSTAKIS, S. L. The Use of Solid Media for Detection of Enzyme Production by Fungi. **Mycologia**, v. 67, n. 3, p. 597–607, 1975. doi:10.1080/00275514.1975.12019782

HAQ, I.; MUKHTAR, H. Biosynthesis of protease from *Lactobacillus paracasei*: Kinetic analysis of fermentation parameters. **Indian Journal of Biochemistry and Biophysics**, v. 43, 2006.

HASGUCMEN, C.K.; SENGUN, I.Y. Viability of probiotic strain *Lactobacillus rhamnosus* and its impact on sensory properties of cheesecake during storage at -20°C and 4°C . **LWT**, v. 134, 2020. doi: 10.1016/j.lwt.2020.109967

HASSAAN, M. et al. Effect of dietary protease at different levels of malic acid on growth, digestive enzymes and haemato-immunological responses of Nile tilapia, fed fish meal free diets. **Aquaculture**, v. 522, p. 735124, 2020.

HASSAN, S.W.M. et al. Production of Cold-Active Lipase by Free and Immobilized Marine *Bacillus cereus* HSS: Application in Wastewater Treatment. **Frontiers in Microbiology**, 2018.

HAYATI **Journal of Biosciences**, v. 24, n. 1, p. 1-5, 2017.

HEJAZI, R., AMIJI, M. Chitosan-based gastrointestinal delivery systems. **Journal of Controlled Release**, v. 89, p. 151–165, 2003.

HILL, C. et al. Expert consensus document: The International Scientific Association for Probiotics and Prebiotics consensus statement on the scope and appropriate use of the term probiotic. **Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology**, v. 11, p. 506-514, 2014.

HILL, D. et al. The *Lactobacillus casei* Group: History and Health Related Applications. **Frontiers in Microbiology**, v. 9, 2018.

HOLLIMAN, R.; BONE, G. Vancomycin resistance of clinical isolates of lactobacilli. **Journal of Infection**, v. 16, n. 3, p. 279-283, 1988.

HOOSHMAND, S.; JUMA, S.; ARJMANDI, B. Combination of Genistin and Fructooligosaccharides Prevents Bone Loss in Ovarian Hormone Deficiency. **Journal of Medicinal Food**, v. 13, n. 2, p. 320-325, 2010.

HOSSAIN, F.; AKHTAR, S.; ANWAR, M. Nutritional Value and Medicinal Benefits of Pineapple. **International Journal of Nutrition and Food Sciences**, v. 4, n. 1, p. 84-88, 2015.

HOSSAIN, M.A. et al. Biochemical, Microbiological and Organoleptic Properties of Probiotic Pineapple Juice Developed by Lactic Acid Bacteria. **Journal Of Scientific Research**, v. 12, n. 4, p. 743-750, 2020.

HOUGAARD, A. et al. Free radical formation by *Lactobacillus acidophilus* NCFM is enhanced by antioxidants and decreased by catalase. **Food Research**

International, v. 79, p. 81-87, 2016.

HUANG, G. et al. Intestine-targeted delivery potency of O-carboxymethyl chitosan-coated layer-by-layer microcapsules: An in vitro and in vivo evaluation. **Materials Science and Engineering: C**, v. 105, p. 110129, 2019.

HUANG, Y-Y. et al. Preparation of yogurt-flavored bases by mixed lactic acid bacteria with the addition of lipase. **LWT**, v. 131, 2020. DOI: doi.org/10.1016/j.lwt.2020.109577

HÜTT, P. et al. Antagonistic activity of probiotic lactobacilli and bifidobacteria against entero- and uropathogens. **Journal of Applied Microbiology**, v.100, n. 6, 2006.

IANIRO, G.; PECERE, S.; GIORGIO, V.; GASBARRINI, A.; CAMMAROTA, G. Digestive Enzyme Supplementation in Gastrointestinal Diseases. **Current Drug Metabolism**, v. 17, n. 2, p. 187-193, 2016.

IICA. **Umbu, cajá e espécies afins**: Spondias spp. Instituto Interamericano de Cooperación para la Agricultura (IICA). San José, CR: Procisa. Disponível em: < http://www.procisur.org.uy/adjuntos/procisur_spondias_0ae.pdf > acesso em 06 mar. 2020.

INGLIN, et al. High-throughput screening assays for antibacterial and antifungal activities of Lactobacillus species. **Journal of Microbiological Methods**, v.114, p. 26-29, 2015.

INSTITUTO ADOLFO LUTZ (IAL). **Métodos físico-químicos para análise de alimentos**, 1ª ed. Imprensa. São Paulo, 2008.

ISLAM, F. ROY, N. Screening, purification and characterization of cellulase from cellulase producing bacteria in molasses. **BMC Research Notes**, v. 11, n. 45, 2018.

ISLAM, M.Z. Development of probiotic beverage using whey and pineapple (Ananas comosus) juice: Sensory and physico-chemical properties and probiotic survivability during in-vitro gastrointestinal digestion. **Journal of Agriculture and Food Research**, v. 4, 2021. doi.org/10.1016/j.jafr.2021.100144

JACOBSEN, C.N. et al. Screening of Probiotic Activities of Forty-Seven Strains of Lactobacillus spp. by In Vitro Techniques and Evaluation of the Colonization Ability of Five Selected Strains in Humans. **Applied Environmental Microbiology**, 1999.

JANG, H.; LEE, N.; PAIK, H. Probiotic characterization of Lactobacillus brevis KU15153 showing antimicrobial and antioxidant effect isolated from kimchi. **Food Science and Biotechnology**, v. 28, n. 5, p. 1521-1528, 2019.

JOHNSON, J. et al. Taxonomy of the Lactobacillus acidophilus Group. **International Journal of Systematic Bacteriology**, v. 30, n. 1, p. 53-68, 1980.

KAFEEL, H. Antidepressant activity on methanolic extract of *Ananas comosus* Linn peel (MeACP) by using forced swim and tail suspension apparatus in mice. **Science International**, v.28, n. 3, p. 2525-2531, 2016.

KAMBALE, R.M. et al. Effects of probiotics and synbiotics on diarrhea in undernourished children: Systematic review with meta-analysis. **Clinical Nutrition**, v. 40, n. 5, p. 3158-3169, 2021. DOI: 10.1016/j.clnu.2020.12.026

KAMBLE, P.P. et al. Enhanced inulinase production by *Fusarium solani* JALPK from invasive weed using response surface methodology. **Journal of Microbiological Methods**, v. 159, 2019.

KANKAINEN, M. et al. Comparative genomic analysis of *Lactobacillus rhamnosus* GG reveals pili containing a human- mucus binding protein. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v.106, n.40, p. 17193–17198, 2009.

KARGUTKAR, S.; BRIJESH, S. Anti-rheumatic activity of *Ananas comosus* fruit peel extract in a complete Freund's adjuvant rat model. **Pharmaceutical Biology**, v. 54, n. 11, p. 2616-2622, 2016.

KHAN, I. et al. Enzyme-Embedded Degradation of Poly(ϵ -caprolactone) using Lipase-Derived from Probiotic *Lactobacillus plantarum*. **ACS Omega**, v. 4, n. 2, 2019. DOI: 10.1021/acsomega.8b02642

KHAN, I. et al. Probiotic lipase derived from *Lactobacillus plantarum* and *Lactobacillus brevis* for biodiesel production from waste cooking olive oil: an alternative feedstock. **International Journal of Green Energy**, v. 17, 2020. DOI: 10.1080/15435075.2019.1688157

KIM, S.; LIM, S.D. Separation and Purification of Lipase Inhibitory Peptide from Fermented Milk by *Lactobacillus plantarum* Q180. **Food Science of Animal Resources**, v. 40, n. 1, p. 87–95, 2020. DOI: 10.5851/kosfa.2019.e87

KINGWATEE, N. et al. Spray drying *Lactobacillus casei* 01 in Lychee juice varied carrier materials. **Food Science and Technology**, v. 62, p. 847-853, 2015.

KONAR, N. Effect of Inulin DP on Various Properties of Sugar-Free Dark Chocolates Containing *Lactobacillus paracasei* and *Lactobacillus acidophilus*. **International Journal of Food Engineering**, 2017. DOI: 10.1515/ijfe-2017-0045

KRASAEKOOPT, W.; WATCHARAPOKA, S. Effect of addition of inulin and galactooligosaccharide on the survival of microencapsulated probiotics in alginate beads coated with chitosan in simulated digestive system, yogurt and fruit juice. **Food Science and Technology**, v. 57, p. 761-766, 2014.

KUHAD, R. C.; GUPTA, R.; SINGH, A. Microbial Cellulases and Their Industrial Applications. **Enzyme Research**, v. 2011, p. 1–10, 2011.

KUMARI, A. et al. Probiotic attributes of indigenous *Lactobacillus* spp. isolated from traditional fermented foods and beverages of north-western Himalayas using

in vitro screening and principal component analysis. **Journal of Food Science and Technology**, v. 53, n. 5, p. 2463-2475, 2016.

KUMORO, A.C.; ALHANIF, M.; WARDHANI, D.H. A Critical Review on Tropical Fruits Seeds as Prospective Sources of Nutritional and Bioactive Compounds for Functional Foods Development: A Case of Indonesian Exotic Fruits. **International Journal of Food Science**, v. 2020, p. 1-15, 2020.

KURT, A.S.; CEKMECELIOGLU, D. Bacterial cellulase production using grape pomace hydrolysate by shake-flask submerged fermentation. **Biomass Conversion and Biorefinery**, 2021. doi.org/10.1007/s13399-021-01595-7

LEE, J. et al. Medicinal Effects of Bromelain (*Ananas comosus*) Targeting Oral Environment as an Anti-oxidant and Anti-inflammatory Agent. **Journal of Food and Nutrition Research**, v. 6, n. 12, p. 773-784, 2018.

LEE, J. et al. The potential use of bromelain as a natural oral medicine having anticarcinogenic activities. **Food Science & Nutrition**, v. 7, n. 5, p. 1656-1667, 2019.

LEE, K. et al. Probiotic bacteria, *B. longum* and *L. acidophilus* inhibit infection by rotavirus *in vitro* and decrease the duration of diarrhea in pediatric patients. **Clinics and Research in Hepatology and Gastroenterology**, v. 39, n.2, p. 237-244. 2015.

LEE, N.K.; KIM, S.Y.; HAN, K.J.; EOM, S.J.; PAIK, H.D. Probiotic potential of *Lactobacillus* strains with anti-allergic effects from kimchi for yogurt starters. **LWT – Food and Technology**, v. 58, n.1. 2014.

LEE, S.Y.; GANESAN, P.; AHN, J. KWAK, H.S. Lactobacillus acidophilus Fermented Yam (*Dioscorea opposita* Thunb.) and Its Preventive Effects on Gastric Lesion. **Food Science and Biotechnology**, v.20, n. 4 , p. 927-932, 2011.

LI, N. et al. Cost-effectiveness analysis of oral probiotics for the prevention of Clostridium difficile-associated diarrhoea in children and adolescents. **Journal of Hospital Infection**, v.99, n.4, p. 469-474, 2018.

LI, S. et al. Antioxidant activity of Lactobacillus plantarum strains isolated from traditional Chinese fermented foods. **Food Chemistry**, v. 135, n. 3, p. 1914-1919, 2012.

LIAO, N. et al. Oligosaccharides as co-encapsulating agents: effect on oral Lactobacillus fermentum survival in a simulated gastrointestinal tract. **Biotechnology Letters**, v. 41, n. 2, p. 263-272, 2018.

LIU, C. et al. Antibiotic resistance of probiotic strains of lactic acid bacteria isolated from marketed foods and drugs. **Biomedical and Environmental Sciences**, v.22, p. 401-412, 2009.

LIU, L. et al. Isomaltooligosaccharide increases the Lactobacillus rhamnosus viable

count in Cheddar cheese. **International Journal of Dairy Technology**, v. 68, n. 3, p. 389-398, 2015.

LIU, Y. et al. Chemical composition, structure, physicochemical and functional properties of rice bran dietary fiber modified by cellulase treatment. **Food Chemistry**, v. 342, p. 128352, abr. 2021.

LOBO, A. et al. Fructo-oligosaccharides and iron bioavailability in anaemic rats: the effects on iron species distribution, ferroportin-1 expression, crypt bifurcation and crypt cell proliferation in the caecum. **British Journal of Nutrition**, v. 112, n. 8, p. 1286-1295, 2014.

LOBO, M.G.; PAULL, R.E. Handbook of Pineapple Technology: Production, Postharvest Science, Processing and Nutrition, 2017.

LOLLO, P.C.B. et al. Hypertension parameters are attenuated by the continuous consumption of probiotic Minas cheese. **Food Research International**, v.76, n. 3, p.611-617. 2015.

LOPES NETO, J.J et al. Estudo botânico, fitoquímico e avaliação de atividades biológicas do fruto de Ananas comosus var. comosus (L.) Merrill (Bromeliaceae). **Gaia Scientia**, v. 9, n. 1, 2015.

LOREA, G.L.; VALDEZ, G.F. A Low-pH-Inducible, Stationary-Phase Acid Tolerance Response in *Lactobacillus acidophilus* CRL 639. **Current Microbiology**, v. 42, p. 21–25, 2001.

LU, Y. et al. Potential of three probiotic lactobacilli in transforming star fruit juice into functional beverages. **Food Science & Nutrition**, v. 5, p. 2141– 2150, 2018. <https://doi.org/10.1002/fsn3.775>

LUEPKE, N.P.; KEMPER, F.H. The HET-CAM test: An alternative to the draize eye test. **Food and Chemical Toxicology**, v. 24, n. 6–7, p. 495-496, 1986.

MA, Y.Y. et al, 2013. Effects of probiotics on nonalcoholic fatty liver disease: A meta-analysis. **World Journal of Gastroenterology**, v.19, n.40, p. 6911–6918. 2013.

MaCFARLANE, G.T.; MaCFARLANE, S. Human Colonic Microbiota: Ecology, Physiology and Metabolic Potential of Intestinal Bacteria. **Scandinavian Journal of Gastroenterology**, v. 32, 1997.

MAJEED, M. et al. Effect of Ananas comosus L. Dried Cuts and Leave Extract on hypercholesterolemic Rats. **The International Journal of Biological Research**, v.2, n. 4, p. 430-439; 2019.

MALILAY, J.K. et al. Functional, safety and technological properties of *Lactobacillus acidophilus* Biotech 1900. **Philippine Journal of Veterinary and Animal Sciences**, v.45, n. 1, p.11-21, 2019.

MALIK, M. Growth studies of potentially probiotic lactic acid bacteria (*Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus acidophilus*, and *Lactobacillus casei*) in carrot and beetroot juice substrates. **Journal of Food Processing and Preservation**.

MAMO, J.; ASSEFA, F. The Role of Microbial Aspartic Protease Enzyme in Food and Beverage Industries. **Journal of Food Quality**, v. 2018, p. 1-15, 2018.

MANASIAN, P. et al. First Evidence of Acyl-Hydrolase/Lipase Activity From Human Probiotic Bacteria: *Lactobacillus rhamnosus* GG and *Bifidobacterium longum* NCC 2705. **Frontiers in Microbiology**, 2020. DOI: doi.org/10.3389/fmicb.2020.01534

MAROJU, P.A. et al. *Lactobacillus amylovorus* derived lipase-mediated silver derivatization over poly(ϵ -caprolactone) towards antimicrobial coatings. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 150, 2021. DOI: 10.1016/j.enzmictec.2021.109888

MASHAK, Z. Antimicrobial Activity of *Lactobacillus* Isolated From Kashk-e Zard and Tarkhineh, Two Iranian Traditional Fermented Foods. **International Journal of Enteric Pathogens**, v. In Press, n. In Press, 2016.

MASSOUNGA BORA, A. et al. Improved Viability of Microencapsulated Probiotics in a Freeze-Dried Banana Powder During Storage and Under Simulated Gastrointestinal Tract. **Probiotics and Antimicrobial Proteins**, v. 11, n. 4, p. 1330-1339, 2018.

MATHIPA, M.; THANTSHA, M. 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**, v. 7, n. 1, 2015. doi:10.1186/s13099-015-0053-5

MAVANI, H. et al. Antimicrobial Efficacy of Fruit Peels Eco-Enzyme against *Enterococcus faecalis*: An In Vitro Study. **International Journal of Environmental Research and Public Health**, v. 17, n. 14, p. 5107, 2020.

MONK, A. et al. Feasibility of a High-Flux Anticancer Drug Screen Using a Diverse Panel of Cultured Human Tumor Cell Lines. **Journal of the National Cancer Institute**, v. 83, n. 11, p. 757–766, 1991.

MOOSAVI-NASAB, M. et al. Use of Enzyme Extract from *Lactobacillus casei*, *Aspergillus niger* & *Aspergillus oryzae* for Production of Enzyme-Modified Cheese. **Journal of Food Technology and Nutrition**, v. 15, n. 60, p. 1-18, 2018.

MORADI, M.; MARDANI, K.; TAJIK, H. Characterization and application of postbiotics of *Lactobacillus* spp. on *Listeria monocytogenes* in vitro and in food models. **LWT**, v. 111, p. 457-464, 2019.

MORROW, L.E. ; Gogineni, V.; Malesker, M.A. Probiotics in the intensive care unit. **Nutritional Clinical Practice**, v.27, p. 235-241, 2012.

NAIDU, M.A.; SARANRAJ, P. Bacterial Amylase: A Review. **International Journal of Pharmaceutical & Biological Archives**, v. 4, n.2, p. 274-287, 2013.

NATH, A. et al. Biological Activities of Lactose-Derived Prebiotics and Symbiotic with Probiotics on Gastrointestinal System. **Medicina**, v. 54, n. 2, p. 18, 2018.

NAVAEI, M. et al. The Effects of Synbiotic Supplementation on Antioxidant Capacity and Arm Volumes in Survivors of Breast Cancer-Related Lymphedema. **Nutrition and Cancer**, v. 72, n. 1, p. 62-73, 2019.

NAZZARO, F. et al. The prebiotic source influences the growth, biochemical features and survival under simulated gastrointestinal conditions of the probiotic *Lactobacillus acidophilus*. **Anaerobe**, v. 18, n. 3, p. 280-285, 2012.

NGUYEN, B.T. et al. Probiotic Beverage From Pineapple Juice Fermented With *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* Strains. **Frontiers in Nutrition**, v. 6, n. 54, doi: 10.3389/fnut.2019.00054

NIKAEIN, F.; ZARGARAN, A.; MEHDIZADEH, A. Rhazes' concepts and manuscripts on nutrition in treatment and health care. **Ancient Science of Life**, v.31, n.4, p. 160-3, 2012.

NIKBAKHT, E. et al. Effect of probiotics and synbiotics on blood glucose: a systematic review and meta-analysis of controlled trials. **European Journal of Nutrition**, v. 57, n. 1, p. 95-106, 2016.

NUALKAEKUL, S.; DEEPIKA, G.; CHARALAMPOPOULOS, D. Survival of freeze dried *Lactobacillus plantarum* in instant fruit powders and reconstituted fruit juices. **Food Research International**, v. 48, n. 2, p. 627–633, 2012.

NUNES, M.L; GARRIDO, M.P. The obesity and the action of prebiotics, probiotics and symbiotics in intestinal microbiota. **Nutrição Brasil**, v. 17, n. 3, 2018.

NUNPAN, S.; SUWANNACHART, C.; WAYAKANON, K. Effect of Prebiotics-Enhanced Probiotics on the Growth of *Streptococcus mutans*. **International Journal of Microbiology**, v. 2019, p. 1-7, 2019.

OKU, T.; NAKAMURA, S. Fructooligosaccharide: Metabolism through Gut Microbiota and Prebiotic Effect. **Food & Nutrition Journal**, v. 3, n. 1, 2017.

OZKAN, T. Survival of *Lactobacillus casei* and functional characteristics of reduced sugar red beetroot yoghurt with natural sugar substitutes. **International Journal of Dairy Technology**, 2020. DOI: 10.1111/1471-0307.12741

PADMAVATHI, T. et al. Screening of potential probiotic lactic acid bacteria and production of amylase and its partial purification. **Journal of Genetic Engineering and Biotechnology**, v. 16, n. 2, p. 357-362, 2018.

PANDEY, K.; NAIK, S.; VAKIL, B. Probiotics, prebiotics and synbiotics- a review. **Journal of Food Science and Technology**, v. 52, n. 12, p. 7577-7587, 2015.

PANGHAL, A. et al. Potential non-dairy probiotic products – A healthy approach. **Food Bioscience**, v. 21, p. 80-89, 2018.

PARKER, M. et al. Naturally Fermented Milk From Northern Senegal: Bacterial Community Composition and Probiotic Enrichment With *Lactobacillus rhamnosus*. **Frontiers in Microbiology**, v. 21, 2018. DOI: 10.3389/fmicb.2018.02218

PARTOVI, R.; GANDOMI, H.; AKHONDZADEH BASTI, A. Safety aspects of *Lactobacillus plantarum* strains isolated from Siahmazgi cheese. **Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi**, 2019.

PARVANEH JAFAREI. *Lactobacillus acidophilus* cell structure and application. **African Journal of Microbiology Research**, v. 5, n. 24, 2011.

PASSOS, D.F.; PEREIRA JUNIOR, N.; CASTRO, A.M. A comparative review of recent advances in cellulases production by *Aspergillus*, *Penicillium* and *Trichoderma* strains and their use for lignocellulose deconstruction. **Current Opinion in Green and Sustainable Chemistry**, v. 15, 2018. DOI: doi.org/10.1016/j.cogsc.2018.06.003

PATO, U.; KHAIRUNNISA, F. Antibiotic resistance and antibacterial activity of dadih originated *Lactobacillus casei* subsp. *Casei* R-68 against food borne pathogens. **Asian Journal of Microbiology, Biotechnology and Environmental Sciences**, v. 19, n. 3, p.577-87, 2017.

PAZ, M. et al. Brazilian fruit pulps as functional foods and additives: Evaluation of bioactive compounds. **Food Chemistry**, v. 172, p. 462-468, 2015.

PEDERSEN, C. et al. Gut hormone release and appetite regulation in healthy non-obese participants following oligofructose intake. A dose-escalation study. **Appetite**, v. 66, p. 44-53, 2013.

PEIXOTO, D.E. et al., Uso do mel de abelha associado ao Ananas comosus (Bromelin) no tratamento da tosse irritativa aguda. **Revista Paulista De Pediatria**, v. 34, n. 4, p.412-417, 2016.

PELAIS, A.C.A., et al. Viabilidade de bactérias probióticas do gênero *Lactobacillus* em néctar de taperebá: efeito nas propriedades físico-químicas e sensoriais. **Brazilian Journal of Development**, v. n.5, p. 25945-60, 2020.

PEREDO, A. et al. The effect of prebiotics on the viability of encapsulated probiotic bacteria. **LWT**, v. 73, p. 191-196, 2016.

PEREIRA, A.L.F.; Rodrigues, S. Turning fruit juice into probiotic beverages. *In*: Fruit Juices. Academic Press, p. 279-287, 2018.

PERRICONE, M. et al. Challenges for the Production of Probiotic Fruit Juices. **Beverages**, v.1, n.2, p. 95-103, 2015.

PHAM, V.H.T. et al. Coconut Mesocarp-Based Lignocellulosic Waste as a

Substrate for Cellulase Production from High Promising Multienzyme-Producing *Bacillus amyloliquefaciens* FW2 without Pretreatments. **Microorganisms**, v. 10, n. 2, 2022. doi:10.3390/microorganisms10020327

PIMENTEL, T. et al. Vegan probiotic products: a modern tendency or the newest challenge in functional foods. **Food Research International**, v. 141, 2020.

PINTO, W.S et al. Caracterização física, físico-química e química de frutos de genótipos de cajazeiras. **Revista Agropecuária Brasileira**, v. 38, n. 9, p. 1059-1066, 2003.

PITHVA, Sheetal et al. Potential of probiotic *Lactobacillus* strains as food additives. INTECH Open Access Publisher, 2012.

PITINO, I. et al. Survival of *Lactobacillus rhamnosus* strains inoculated in cheese matrix throughout the transit in the upper gastro-intestinal tract. **Journal of Biotechnology**, v. 150, p. 566-566, 2010.

PLAZA-DÍAZ, J. et al. Evidence of the Anti-Inflammatory Effects of Probiotics and Synbiotics in Intestinal Chronic Diseases. **Nutrients**, v. 9, n. 6, p. 555, 2017.

POLETO, G. et al. Encapsulation of *Lactobacillus acidophilus* and different prebiotic agents by external ionic gelation followed by freeze-drying. **Ciência Rural**, v. 49, n. 2, 2019.

PRAVEEN, M.A. et al. Cytotoxic and pharmacokinetic studies of Indian seaweed polysaccharides for formulating raindrop synbiotic candy. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 154, n. 1, p. 557-566, 2020. doi: 10.1016/j.ijbiomac.2020.03.086

PURAMA, R. et al. Prebiotics and Probiotics in Altering Microbiota. **Immunity and Inflammation in Health and Disease**, p. 403-413, 2018.

RAJARAJAN, P., et al. In vitro evaluation of antimicrobial activity and probiotic potential of *Lactobacillus* strains against some human pathogens. **Research in Science and Technological Education**, v. 10, p. 31-35, 2018.

RAJOKA, M.R. et al. Identification, characterization, and probiotic potential of *Lactobacillus rhamnosus* isolated from human milk. **LWT**, v. 84, p. 271-280, 2017.

RANA, N. et al. Application of amylase producing bacteria isolated from hot spring water in food industry. **Annals of Phytomedicine: An International Journal**, v. 6, n. 2, 2017.

RANADHEERA, C.S. et al. Probiotic viability and physico-chemical and sensory properties of plain and stirred fruit yogurts made from goat's milk. **Food Chemistry**, v. 135, n. 3, p. 1411-1418, 2012.

RANADHEERA, R. D. C. S.; BAINES, S. K.; ADAMS, M. C. Importance of food in probiotic efficacy. **Food Research International**, v. 43, n. 1, 1–7, 2010.

doi:10.1016/j.foodres.2009.09.009

RAVESCHOT, C. et al. Production of Bioactive Peptides by Lactobacillus Species: From Gene to Application. **Frontiers in Microbiology**, 2019. DOI: doi.org/10.3389/fmicb.2018.02354

RE, R. et al. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 26, n. 9-10, p. 1231-1237, 1999.

REIS, F.S. et al. Functional foods based on extracts or compounds derived from mushrooms. **Trends in Food Science & Technology**, v. 66, p. 48-62, 2017.

REIS, S.A.; CONCEIÇÃO, L.L.; ROSA, D.D.; SIQUEIRA, N.P.; PELUZIO, M.G. Mechanisms responsible for the hypocholesterolaemic effect of regular consumption of probiotics. **Nutrition Research Reviews**, v.30, n.1., p. 36-49, 2017.

REUNANEN, J.; von OSSOWSKI, I.; HENDRICKX, AP; PALVA A; DE VOS WM. Characterization of the SpaCBA pilus fibers in the probiotic Lactobacillus rhamnosus GG. **Applied Environment Microbiology**, v.78, n.7, p. 2337-44, 2012.

RIBEIRO, A.P.O. et al. Development of a probiotic non-fermented blend beverage with juçara fruit: Effect of the matrix on probiotic viability and survival to the gastrointestinal tract. **LWT**, v. 118, 2020. doi.org/10.1016/j.lwt.2019.108756

RIBEIRO, E.S.S. et al. Fermented yellow mombin juice using Lactobacillus acidophilus NRRL B-4495: Chemical composition, bioactive properties and survival in simulated gastrointestinal conditions. **PLOS One**, v. 15, n. 9, 2020. doi.org/10.1371/journal.pone.0239392

RICCI, A. et al. Use of Dairy and Plant-Derived Lactobacilli as Starters for Cherry Juice Fermentation. **Nutrients**, v. 11, n. 2, 2019.

ROBERFROID, M. et al. Prebiotic effects: metabolic and health benefits. **British Journal of Nutrition**, v. 104, n. S2, p. S1-S63, 2010.

ROBERTS, D. Viability of Lactobacillus plantarum NCIMB 8826 in fermented apple juice under simulated gastric and intestinal conditions. **LWT**, v. 97, p. 155-150, 2018. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2018.06.036>

ROCHA, A.M.; SOUZA, D.O.; SILVA, M. S. Abacaxi de Itaberaba: A Pérola do Nordeste Baiano que Merece ser Protegido/Bahia. **Revista INGI - Indicação Geográfica e Inovação**, v.3, n. 2, 2019.

ROGERS, S. Novel applications of live bacteria in food services: probiotics and protective cultures. **Trends in Food Science & Technology**, v. 19, n. 4, p.188-197, 2008.

ROLIM, F.R.L. Survival of *Lactobacillus rhamnosus* EM1107 in simulated gastrointestinal conditions and its inhibitory effect against pathogenic bacteria in semi-hard goat cheese. **LWT – Food Science and Technology**, v.63, n.2, p. 807-813, 2015.

ROUSSEAU, C. et al. *Lactobacillus acidophilus* modulates intestinal pain and induces opioid and cannabinoid receptors. **Nature Medicine**, v. 13, n. 1, p. 35-37, 2006.

ROXAS, M. The role of enzyme supplementation in digestive disorders. **Alternative Medicine Review**, v. 13, n. 4, 2008.

RUOFF, K. et al. Vancomycin-resistant gram-positive bacteria isolated from human sources. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 26, n. 10, p. 2064-2068, 1988.

SADHU, S.; MAITI, T.K. Cellulase Production by Bacteria: A Review. **British Microbiology Research Journal**, v. 3, n. 3, p. 235-258, 2013.

SALAMA, M.S. et al. An Ecological Study of Lactic Acid Bacteria: Isolation of New Strains of *Lactococcus* Including *Lactococcus lactis* subspecies *cremoris*. **Journal of Dairy Science**, v. 78, n. 5, p. 1004-1017, 1995.

SAMINATHAN, M. et al. Effect of prebiotic oligosaccharides on growth of *Lactobacillus* strains used as a probiotic for chickens. **African Journal of Microbiology Research**, v. 5, n. 1, p. 57-64, 2011.

SANCHEZ, B. et al. Probiotics, gut microbiota, and their influence on host health and disease. **Molecular Nutrition & Food Research**, 2016.

SÁNCHEZ, Ó.; BARRAGÁN, P.; SERNA, L. Review of *Lactobacillus* in the food industry and their culture media. **Revista Colombiana de Biotecnología**, v. 21, n. 2, p. 63-76, 2019.

SANTOS, D.X. Improved probiotic survival to in vitro gastrointestinal stress in a mousse containing *Lactobacillus acidophilus* La-5 microencapsulated with inulin by spray drying. **LWT**, v. 99, p. 404-410. DOI: 10.1016/j.lwt.2018.10.010

SAPTARINI, N.; RAHAYU, D.; HERAWATI, I. Antioxidant activity of crude bromelain of pineapple (*Ananas comosus* (L.) Merr) crown from Subang district, Indonesia. **Journal of Pharmacy And Bioapplied Sciences**, v. 11, n. 8, p. 551, 2019.

SARAO, L.; ARORA, M. Probiotics, prebiotics, and microencapsulation: A review. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 57, n. 2, p. 344-371, 2015.

SCHMITT, J.D.; FARIÑA, L.O.; SIMÕES, M.R.; KOTTWITZ, L.B.M. Evaluation of the Probiotic Profile of the *Lactobacillus Acidophilus* Used in Pharmaceutical and Food Applications. **Acta Scientiarum. Health Sciences**, v.40, n.1, 2018.

SELVAKUMAR, P.; PANDEY, A. Solid state fermentation for the synthesis of inulinase from *Staphylococcus* sp. and *Kluyveromyces marxianus*. *Process Biochemistry*, v. 34, n. 8, p. 851-855, 1999. doi.org/10.1016/S0032-9592(99)00008-4

SHAIKHIN, S. et al. Investigation of Acid and Bile Tolerance, Antimicrobial Activity and Antibiotic Resistance of *Lactobacillus* Strains Isolated from Kazakh Dairy Foods. **Asian Journal of Applied Sciences**, v. 9, n. 4, p. 143-158, 2016.

SHARMA, M. et al. A Review on Microbial Alkaline Protease: An Essential Tool for Various Industrial Approaches. **Industrial Biotechnology**, v. 15, n. 2, p. 69-78, 2019.

SHARMA, A.D. et al. Inulinase production using garlic (*Allium sativum*) powder as a potential substrate in *Streptomyces* sp. *Journal of Food Engineering*, v. 77, n. 3, p. 486-491, 2006. doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2005.06.072

SHEEHAN, V.M.; ROSS, P. ; FITZGERALD, G.F. Assessing the acid tolerance and the technological robustness of probiotic cultures for fortification in fruit juices. **Innovative Food Science and Emerging Technologies**, v. 8, p. 279-284, 2007.

SHIM, Y.; LEE, S.; LEE, J. Antimicrobial activity of *Lactobacillus* strains against uropathogens. **Pediatrics International**, v. 58, n. 10, p. 1009-1013, 2016.

SHIROTANI, N. Proteolytic activity of selected commercial *Lactobacillus helveticus* strains on soy protein isolates, **Food Chemistry**, v. 340, 2021. DOI: doi.org/10.1016/j.foodchem.2020.128152

SHOKRYAZDAN, P. et al. Effects of prebiotics on immune system and cytokine expression. **Medical Microbiology and Immunology**, v. 206, n. 1, p. 1-9, 2016.

SHOKRYAZDAN, P. et al. Probiotic Potential of *Lactobacillus* Strains with Antimicrobial Activity against Some Human Pathogenic Strains. **BioMed Research International**, 2014.

SHORI, A. Microencapsulation Improved Probiotics Survival During Gastric Transit. HAYATI **Journal of Biosciences**, v. 24, n. 1, p. 1-5, 2017.

SILVA, J.R.; SILVA, J.B.; COSTA, G.N.; SANTOS, J.S.; CASTRO-GOMEZ, R.J.H. Probiotic gummy candy with xylitol: development and potential inhibition of *Streptococcus mutans* UA 159. **Research, Society and Development**, v. 9, n. 10, 2020. doi: 10.33448/rsd-v9i10.8942

SILVA, T.H. et al. Screening for the production of multiples enzymes hydrolytic by bacteria from polluted urban stream in Recife/Pernambuco, Brazil. **International Journal of Current Research**, v.11, n.2, 2019.

SINGH, A.; BAJAR, S.; DEVI, A.; PANT, D. An overview on the recent developments in fungal cellulase production and their industrial applications. **Bioresource Technology Reports**, v. 14, 2021.

SINGH, R. S.; CHAUHAN, K.; KENNEDY, J. F. A panorama of bacterial inulinases: Production, purification, characterization and industrial applications. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 96, p. 312–322, mar. 2017.

SINGH, R. S.; SINGH, R. P. Inulinases. In: **Current Developments in Biotechnology and Bioengineering**. [s.l.] Elsevier, 2017. p. 423–446.

SINGH, R. S. et al. Statistical optimization of solid-state fermentation for the production of fungal inulinase from apple pomace. **Bioresource Technology Reports**, v. 9, 2020. doi.org/10.1016/j.biteb.2019.100364

SIQUEIRA, J.G.W.; RODRIGUES, C.; VANDENBERGHE, L.P.S. et al. Current advances in on-site cellulase production and application on lignocellulosic biomass conversion to biofuels: A review. **Biomass and Bioenergy**, v. 132, p. 105419, 2020.

SIVIERI, K. et al. Prebiotic Effect of Fructooligosaccharide in the Simulator of the Human Intestinal Microbial Ecosystem (SHIME®Model). **Journal of Medicinal Food**, v. 17, n. 8, p. 894-901, 2014.

SLOVER, C.M.; DANZIGER, L. *Lactobacillus*: a Review. **Clinical Microbiology Newsletter**, v. 30, n. 4, p. 23-27. 2008.

SO, S.S.Y.; WAN, M.L.Y; EI-NEZAMY, H. Probiotics-mediated suppression of cancer. **Current Opinion in Oncology**, v.29, n.1, p.62-72, 2017.

SOARES, E.B. et al. Caracterização Física E Química De Frutos De Cajazeira. **Revista brasileira de fruticultura**, v. 28, n. 3, p. 518-519, 2006.

SOLEIMANI, S.S. et al. Lactobacillus brevis Lipase: Purification, Immobilization onto Magnetic Florosil NPs, Characterization and Application as a Detergent Additive. **Tenside Surfactants Detergents**, v. 54, n. 3, 2017. DOI: doi.org/10.3139/113.110495

SOLIERI, L. et al. Peptidomic study of casein proteolysis in bovine milk by Lactobacillus casei PRA205 and Lactobacillus rhamnosus PRA331. **International Dairy Journal**, v. 85, p. 237-246, 2018.

SONG, Y.; SU, W.; MU, Y. C. Modification of bamboo shoot dietary fiber by extrusion-cellulase technology and its properties. **International Journal of Food Properties**, v. 21, n. 1, p. 1219–1232, 1 jan. 2018.

SOUZA, F.C.A. et al. Alimentos Funcionais No Manejo Do Diabetes Melitus Tipo 2: Uma Abordagem Bibliográfica. **Ciência & Saberes**, v. 3, n. 4, 2017.

SPERRY, M.F. Probiotic Minas Frescal cheese added with L. casei 01: Physicochemical and bioactivity characterization and effects on hematological/biochemical parameters of hypertensive overweighted women – A randomized double-blind pilot trial. **Journal of Functional Foods**, v. 45, p. 435-

443, 2018. DOI: 10.1016/j.jff.2018.04.015

STANTON, C.; ROSS, R.P.; FITZGERALD, G.F.; SINDEREN, V.D. Fermented functional foods based on probiotics and their biogenic metabolites. **Current opinion in Biotechnology**, v. 16, n.2, p. 198-203, 2005.

STEFANIAK, T. et al. Selected prebiotics and synbiotics administered in ovo can modify innate immunity in chicken broilers. **BMC Veterinary Research**, v. 15, n. 1, 2019.

SUCCI, M. et al. Pre-cultivation with Selected Prebiotics Enhances the Survival and the Stress Response of *Lactobacillus rhamnosus* Strains in Simulated Gastrointestinal Transit. **Frontiers in Microbiology**, 2017.

SUDIBYO, A. Designing functional beverages process: highlighting lessons learned from research and development. **Journal Industrial Hasil Perkebunan**, v.13, n.1, 2018.

SUN, F. et al. Purification and biochemical characteristics of the protease from *Lactobacillus brevis* R4 isolated from Harbin dry sausages. **LWT**, v. 113, 2019. DOI: doi.org/10.1016/j.lwt.2019.108287

SWARGIARY, A.; ROY, M.; DAIMARI, M. Survey and documentation of putative anthelmintic plants used in ethnomedicinal systems of tribal communities of Baksa District of Assam. **Medicinal Plants - International Journal of Phytomedicines and Related Industries**, v. 11, n. 4, p. 368, 2019.

SZAJEWSKA, H.; KOŁODZIEJ, M. Systematic review with meta-analysis: *Lactobacillus rhamnosus* GG in the prevention of antibiotic-associated diarrhoea in children and adults. **Alimentary Pharmacology and Therapeutics**, v.42, p. 1149–1157. 2015.

SZYMÁNSKI, H. et al. Colonisation of the gastrointestinal tract by probiotic *L. rhamnosus* strains in acute diarrhoea in children. **Digestive and Liver Disease**, v.38, n.2, p.274-176. 2006.

TALWALKAR, A.; KAILASAPATHY, K. A Review of Oxygen Toxicity in Probiotic Yogurts: Influence on the Survival of Probiotic Bacteria and Protective Techniques. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, v. 3, n. 3, p. 117–124, 2003. doi:10.1111/j.1541-4337.2004.tb00061.x

TAN, J.S. et al. Chitin extraction from shrimp wastes by single step fermentation with *Lactobacillus acidophilus* FTDC3871 using response surface methodology. **Journal of Food Processing and Preservation**, v. 44, n. 11, 2020. DOI: 10.1111/jfpp.14895

TAVANO, O.L. et al. Biotechnological Applications of Proteases in Food Technology. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, v. 17, n. 2, p. 412-436, 2018.

TEJERO-SARIÑENA, S., et al. In vitro evaluation of the antimicrobial activity of a range of probiotics against pathogens: evidence for the effects of organic acids. **Anaerobe**, v. 18, n. 5, p. 530-8, 2012.

TENEVA, D. et al. Biological preservation of mayonnaise with *Lactobacillus plantarum* LBRZ12, dill, and basil essential oils. **Food Chemistry**, v. 344, n. 15, 2021. doi: 10.1016/j.foodchem.2020.128707

THAPA, S., MISHRA, J. ARORA, N.K. et al. Correction to: Microbial cellulolytic enzymes: diversity and biotechnology with reference to lignocellulosic biomass degradation. **Reviews in Environmental Science and Bio/Technology**, v. 19, n. 3, p. 649-649, 2020.

THILAKARATHNA, W.; LANGILLE, M.; RUPASINGHE, H. Polyphenol-based prebiotics and synbiotics: potential for cancer chemoprevention. **Current Opinion in Food Science**, v. 20, p. 51-57, 2018.

TIBURSKI, J. et al. Nutritional properties of yellow mombin (*Spondias mombin* L.) pulp. **Food Research International**, v. 44, n. 7, p. 2326-2331, 2011.

TIDERENCEL, K.; HUTCHEON, D.; ZIEGLER, J. Probiotics for the treatment of type 2 diabetes: A review of randomized controlled trials. **Diabetes/Metabolism Research and Reviews**, v. 36, n. 1, 2019.

TORDZAGLA, N. In vivo antiplasmodial activity of extracts of selected Ghanaian medicinal plants. **Investigational Medicinal Chemistry and Pharmacology**, v. 1, n. 2, p. 1-9, 2018.

ULLAH, H. et al. Characterization of Halophilic Inulinase Producing Strains of *Bacillus* and *Klebsiella* Species Isolated From the Salt Mines of Pakistan. **Geomicrobiology Journal**, 2022. DOI: 10.1080/01490451.2022.2055235

UMAR, Y.H. Probiotication of fruit juices by supplemented culture of *Lactobacillus acidophilus*. **International Journal of Food Science and Nutrition Engineering**, v. 9, n. 2, p. 45-48, 2019. DOI: 10.5923/j.food.20190902.03

VAFA, S. et al. The effects of synbiotic supplementation on serum inflammatory markers and edema volume in breast cancer survivors with lymphedema. **EXCLI Journal**, v. 19, p.1-5, 2020.

VALLIANOU, N. et al. Probiotics, Prebiotics, Synbiotics, Postbiotics, and Obesity: Current Evidence, Controversies, and Perspectives. **Metabolism**, v. 9, p. 179–192, 2020.

VAN DE GUCHTE, M. et al. Stress responses in lactic acid bacteria. **Antonie Van Leeuwenhoek**, v. 82, p.187–216, 2002. doi.org/10.1023/A:1020631532202

VASSILOPOULOU, L. et al. Effectiveness of probiotics and synbiotics in reducing duration of acute infectious diarrhea in pediatric patients in developed countries: a

systematic review and meta-analysis. **European Journal of Pediatrics**, v. 180, p. 2907–2920, 2021.

VEMURI, R. et al. A human origin strain *Lactobacillus acidophilus* DDS-1 exhibits superior in vitro probiotic efficacy in comparison to plant or dairy origin probiotics. **International Journal of Medical Sciences**, v.15, n.9, p. 840-848, 2018.

VIANA, L.F., et al. The reusing technology of guava peel, pulp and core for cookies elaboration. **Brazilian Journal of Development**, v. 6, n. 7, p. 47219-30, 2020.

VIANA, M.R.; NEVES, A.S.; CAMARGO-JUNIOR, K.R.; PRADO, S.D.; MENDONÇA, A.L.O. A racionalidade nutricional e sua influência na medicalização da comida no Brasil. **Ciência & Saúde coletiva**, v.22, n.2, 2017.

VITETTA, L. et al. Gut Microbes manuscript type: Commentary and views submission probiotics, D–Lactic acidosis, oxidative stress and strain specificity. **Gut Microbes**, 2017.

VYAS, P.; SHIRSAT, M. BACTERIAL α -AMYLASE ACTIVITY ON THE STARCH PRESENT IN MAIZE KERNEL. **Innoriginal International Journal of Sciences**, v. 4, n. 4, p. 4-9, 2017.

WAWRZYŃSKA, E.; KUBIES, D. Alginate Matrices for Protein Delivery – a Short Review. **Physiological Research**, p. S319-S334, 2018.

WHITE, J. HEKMAT, S. Development of Probiotic Fruit Juices Using *Lactobacillus rhamnosus* GR-1 Fortified with Short Chain and Long Chain Inulin Fiber. **Fermentation**, v.4, n. 2, 2018. DOI: 10.3390/fermentation4020027

WURLITZER, N.J. et al., Tropical fruit juice: effect of thermal treatment and storage time on sensory and functional properties. **Journal of Food Science and Technology**, v. 56, n. 12, p. 5184-5193, 2019.

XU, Y. et al. Physicochemical properties of potato starch fermented by amylolytic *Lactobacillus plantarum*. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 158, p. 656-661, 2020. DOI: doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2020.04.245

YASSIN, L.S. an overview of Brazilian smoothies: from consumer profile to evaluation of their physicochemical composition, bioactive compounds, antioxidant activity and sensory description. **Journal of Food Bioactives**, v. 10, 2020.

YEE, W. et al., Microencapsulation of *Lactobacillus acidophilus* NCFM incorporated with mannitol and its storage stability in mulberry tea. **Food Science and Technology**, v. 43, 2019. DOI: 10.1590/1413-7054201943005819

YIN, H.; ZHANG, X.; HUANG, J. Study on enzymatic hydrolysis of soybean β -conglycinin using alkaline protease from *Bacillus subtilis* ACCC 01746 and antigenicity of its hydrolysates. **Grain & Oil Science and Technology**, v. 4, n. 1, p. 18–25, 2021.

YOON, KY.; WOODAMS, E.E.; HANG, Y.D. Probiotication of tomato juice by lactic acid bacteria. **The Journal of Microbiology**, v. 42, n. 4, p. 315-8, 2005.

YUNUS, G.; KUDDUS, M. COLD-ACTIVE MICROBIAL CELLULASE: NOVEL APPROACH TO UNDERSTAND MECHANISM AND ITS APPLICATIONS IN FOOD AND BEVERAGES INDUSTRY. **Journal of Microbiology, Biotechnology and Food Sciences**, v. 10, n. 4, p. 524-530, 2021.

ZHANG, Q. et al. Characterization of γ -aminobutyric acid (GABA)-producing *Saccharomyces cerevisiae* and coculture with *Lactobacillus plantarum* for mulberry beverage brewing. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 129, n. 4, p. 447-453, 2020. <https://doi.org/10.1016/j.jbiosc.2019.10.001>

ZHENG, X. et al. Comparing product stability of probiotic beverages using litchi juice treated by high hydrostatic pressure and heat as substrates Innovative **Food Science & Emerging Technologies**, v. 23, p. 61-67, 2014.

ZHENG, Y. et al. Adsorption activity of coconut (*Cocos nucifera* L.) cake dietary fibers: effect of acidic treatment, cellulase hydrolysis, particle size and pH. **RSC Advances**, v.8, p. 2844-2850, 2018. DOI: 10.1039/C7RA13332D

ZHU, W. Functional Efficacy of Probiotic *Lactobacillus sanfranciscensis* in Apple, Orange and Tomato Juices with Special Reference to Storage Stability and In Vitro Gastrointestinal Survival. **Beverages**, v. 6, n. 13, 2020.

ZINJANAB, S. et al. Natural flavor biosynthesis by lipase in fermented milk using in situ produced ethanol. **Journal of Food Science and Technology**, v. 58, p. 1858–1868, 2021. DOI: doi.org/10.1007/s13197-020-04697-8

Žuntar, I.; Petric, Z.; Bursać Kovačević, D.; Putnik, P. Safety of Probiotics: Functional Fruit Beverages and Nutraceuticals. **Foods**, v. 9, n. 947, 2020. <https://doi.org/10.3390/foods9070947>

APÊNDICE A – ARTIGO PUBLICADO NO PERIÓDICO LWT



LWT

Volume 100, February 2019, Pages 391-396



Viabilities of *Lactobacillus rhamnosus* ASCC 290 and *Lactobacillus casei* ATCC 334 (in free form or encapsulated with calcium alginate-chitosan) in yellow mombin ice cream

Tháísa Gabriela Silva de Farias, Hayane Ferreira Leite Ladislau, Thayza Christina Montenegro Stamford, José Alberto Costa Medeiros, Bruna Lúcia Mendonça Soares, Thatiana Montenegro Stamford Arnaud, Tânia Lúcia Montenegro Stamford  

Show more 

+ Add to Mendeley  Share  Cite

<https://doi.org/10.1016/j.lwt.2018.10.084>

Get rights and content

APÊNDICE B – CAPÍTULO PUBLICADO NO LIVRO “AVANÇOS EM
CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE ALIMENTOS - VOLUME 4”

02

“

Alimentos simbióticos: uso da co-encapsulação como forma de veiculação de probióticos e prebióticos

- Thaísa Gabriela Silva de **Farias**
PPGN/UFPE
- Thayza Christina Montenegro **Stamford**
PPGN/UFPE
- Vitória Maria de Souza **Ribeiro**
UFPE
- Hayane Ferreira Leite **Ladislau**
PPGN/UFPE
- José Alberto Costa **Medeiros**
PPGN/UFPE
- Thatiana Montenegro Stamford **Arnaud**
PPGN/UFPE
- Tânia Lúcia Montenegro **Stamford**
PPGN/UFPE