



República Federativa do Brasil  
Ministério da Economia  
Instituto Nacional da Propriedade Industrial

(21) BR 102020010290-7 A2



(22) Data do Depósito: 22/05/2020

(43) Data da Publicação Nacional: 07/12/2021

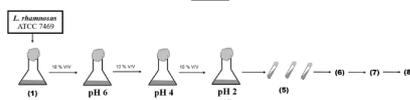
(54) **Título:** PROCESSO DE SELEÇÃO DE *L. RHAMNOSUS* ATCC 7469 EM GRADIENTE ÁCIDO E MATRIZ VEGETAL PARA OBTENÇÃO DE CÉLULAS MAIS RESISTENTES AO TRATO GASTROINTESTINAL E DESENVOLVIMENTO DE UM PRODUTO A PARTIR DAS CÉLULAS SELECIONADAS

(51) **Int. Cl.:** C12N 1/02; C12N 1/20; C12R 1/225.

(71) **Depositante(es):** UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO.

(72) **Inventor(es):** ELOYZA KAROLINE ROZENDO DOS SANTOS; LETÍCIA AUGUSTA NOGUEIRA DE SOUZA VALÉRIO; CHRISTINE LAMENHA LUNA FINKLER; ESTER RIBEIRO DE ANDRADE.

(57) **Resumo:** PROCESSO DE SELEÇÃO DE *L. rhamnosus* ATCC 7469 EM GRADIENTE ÁCIDO E MATRIZ VEGETAL PARA OBTENÇÃO DE CÉLULAS MAIS RESISTENTES AO TRATO GASTROINTESTINAL E DESENVOLVIMENTO DE UM PRODUTO A PARTIR DAS CÉLULAS SELECIONADAS. A presente invenção de patente trata tanto de um processo de seleção em gradiente ácido em suco de maracujá para obtenção de células mais resistentes as condições gástricas e intestinais quanto da formulação de bebida funcional fermentada de maracujá pela ação fermentativa das células selecionadas. A obtenção de células mais resistentes as condições gastrointestinais, partiu da utilização de gradiente ácido em meio à base de maracujá. O processo desenvolvido é simples, econômico, de fácil operação e garante maior sobrevivência de *L. rhamnosus* ATCC 7469 as condições gástricas e intestinais. Além disso, a utilização de meio à base de maracujá, garante que posteriormente o microrganismo possa ser utilizado na elaboração de uma bebida funcional a partir da mesma fruta. Por sua vez, a bebida gerada é caracterizada especialmente por conter as células pré-selecionadas e polpa de maracujá, sendo assim um produto nutricionalmente rico e que pode ser consumido sem restrição pela população. Podendo assim, ser uma alternativa para o consumo de alimentos probióticos, especialmente para alérgicos ou intolerantes a (...).



## **PROCESSO DE SELEÇÃO DE *L. rhamnosus* ATCC 7469 EM GRADIENTE ÁCIDO E MATRIZ VEGETAL PARA OBTENÇÃO DE CÉLULAS MAIS RESISTENTES AO TRATO GASTROINTESTINAL E DESENVOLVIMENTO DE UM PRODUTO A PARTIR DAS CÉLULAS SELECIONADAS**

### **CAMPO DA INVENÇÃO**

[001] A presente patente de invenção trata de um processo de seleção de *L. rhamnosus* ATCC 7469 em gradiente ácido e matriz vegetal para obtenção de células mais resistentes ao trato gastrointestinal e desenvolvimento de um produto a partir das células selecionadas. O processo visa obter células com maior capacidade de sobreviver a condições gastrointestinais e mais adaptadas ao crescimento em suco de maracujá, de forma prática e econômica quando comparado a outras técnicas, que visam maior resistência celular a condições de estresse, como por exemplo, encapsulação ou seleção celular. Além disso, após a etapa de seleção desenvolveu-se uma bebida à base de maracujá a partir das células obtidas. Esse produto, representa uma alternativa para o consumo de produtos probióticos, os quais são representados majoritariamente por variedades lácteas. Sendo assim um produto de origem vegetal, com valor nutricional agregado, sem lactose e com o diferencial de ter células livres mais resistentes as condições gastrointestinais devido a seleção prévia em gradiente ácido.

### **ANTECEDENTES DA INVENÇÃO**

[002] Os processos para a obtenção de cepas de *Lactobacillus* com melhor atividade fermentativa e maior capacidade de resistir ao ácido gástrico e atingir o intestino para assim desempenhar sua ação como agente probiótico, geralmente envolve métodos custosos, como a microencapsulação por pulverização, o que conseqüentemente irá encarecer o processo e os produtos probióticos gerados. Um bom exemplo para a aplicação da microencapsulação

pode ser observado na patente chinesa CN103013972 (A), que descreve um processo para preparação de microcápsulas de alginato de sódio e CaCl<sub>2</sub> contendo o *Lactobacillus casei*, preparadas pelo método de secagem por pulverização.

[003] A secagem por pulverização também é conhecida como secagem por aspersão, secagem por atomização ou *spray dryer*. A utilização dessa técnica apresenta um fator limitante quando aplicada a culturas microbianas, uma vez que a alta temperatura utilizada para a secagem pode inviabilizar o microrganismo a depender da capacidade deste de sobreviver a essa situação de estresse. Desta forma, este tipo de secagem não pode ser utilizado para todos os microrganismos, sendo sempre necessário uma avaliação prévia, afim de verificar se a cepa em questão é capaz de resistir as elevadas temperaturas aplicadas durante o processo. Sendo assim, essa etapa investigativa, torna o processo para obtenção de células com maior resistência as condições gastrointestinais tanto mais custoso quanto mais duradouro.

[004] Outro método que pode ser utilizado no encapsulamento de probióticos, afim de torna-los mais resistentes aos fatores gastrointestinais, é denominado *layer-by-layer*. Essa técnica fundamenta-se na adsorção consecutiva de camadas alternadas de polieletrólito com cargas opostas sobre uma partícula modelo e tem como força principal a interação eletrostática (Kreft, O., Prevot, M., Mohwald, H., Sukhorukov, G. B., Angew. Chem. Int. 2007 46, 5605 - 5608; Jun-Xia, X., Hai-Yan, Y., Jian, Y. Arabic. Food Chemistry. 2011 125, 1267–1272; Mariana de Araújo Etchepare, Maria Fernanda da Silveira Cáceres de Menezes, Andressa Ribas Barreto, Carlos Pasqualin Cavalheiro, Cristiano Ragagnin de Menezes, Ciência e Natura, 2015 37, 75 - 86). Um bom exemplo da sua utilização pode ser observado na patente portuguesa PT108685 A, na qual os inventores desenvolveram uma cápsula imobilizadora de probióticos para a produção de nutrientes no intestino. Dessa forma, o microrganismo não tem contato com as condições adversas do sistema digestivo do consumidor.

No entanto, mesmo sendo uma técnica eficiente para o seu propósito, o método de imobilização demanda maior custo quando comparada com a utilização de probióticos livres na matriz alimentar. Além disso, exige mão de obra especializada e cuidadosamente treinada para a sua devida realização.

[005] Com o propósito de agregar maior resistência celular a condições de estresse do sistema digestivo de maneira menos custosa quando comparada as técnicas de encapsulação, porém eficiente, alguns estudos tem desenvolvido estratégias de pré-tratamento para probióticos a múltiplos fatores de estresse. Um bom exemplo da utilização dessa técnica pode ser observado no trabalho desenvolvido por Mathipa e Thantsha em 2015 na Universidade de Pretória (Gut Pathogens. 2015 7-5). Neste estudo foi verificado que, em meio padrão (MRS (Man, Rogosa e Sharpe) a associação a múltiplos fatores de estresse, como pH ácido, sais biliares e temperatura teria a capacidade de tornar células de *Lactobacillus* mais resistentes a condições gastrointestinais, com aumento de 1 Log UFC/mL na sua sobrevivência após simulação gastrointestinal. Porém, mesmo tendo sido uma técnica eficiente o presente estudo apresenta dois fatores principais que restringem sua aplicação: 1- a adição dos sais biliares ao processo de seleção encarece consideravelmente o mesmo, especialmente por ser um reagente de origem animal com elevado valor de mercado; 2- esta técnica não garante que o microrganismo terá bom desempenho em uma matriz alimentar, que pudesse ser utilizada no desenvolvimento de um produto com potencial alimentício. Além disso, a técnica de seleção desenvolvida por Mathipa e Thantsha (Gut Pathogens. 2015 7-5) se difere da seleção investigada na presente patente, especialmente por não ter sido realizada em uma matriz alimentar que posteriormente pudesse ser utilizada no desenvolvimento de um produto com potencial alimentício, nutricional e sem restrição de consumo.

[006] Além das limitações observadas, a pré-exposição a múltiplos fatores de estresse nem sempre resulta na melhoria da sobrevivência do microrganismo para as condições gastrointestinais.

No trabalho realizado por Sumeri e colaboradores (Ingrid Sumeri, Liisa Arike, Jelena Stekolštšikova, Riin Uusna, Signe Adamberg, Kaarel Adamberg, Toomas Paalme, Appl Microbiol Biotechnol. 2010 86, 1925 – 1931) constatou-se que o pré-tratamento em estresse ácido, em sais biliares e temperatura não apresentou efeito sobre a sobrevivência de três diferentes cepas de *Lactobacillus*, dentre as quais estava *L. rhamnosus* GG. Demonstrando assim, que a efetividade desta técnica também irá depender da espécie e da linhagem utilizada.

[007] Desta forma, como a pré-exposição a múltiplos fatores de estresse parece não resulta em efeito positivo sobre a resistência de *L. rhamnosus* a condições gastrointestinais a presente invenção de patente se propôs a desenvolver um processo que efetivamente melhorasse a sobrevivência desse microrganismo para que assim o mesmo pudesse ser utilizado no desenvolvimento de uma bebida funcional não láctea.

[008] Para a atual invenção de patente foi utilizada a linhagem *L. rhamnosus* ATCC 7469. A escolha dessa cepa para o desenvolvimento do processo e consecutivamente elaboração de um produto se baseia na capacidade, já conhecida, da mesma crescer em matrizes vegetais como maracujá amarelo (*Passiflora edulis*), maracujá da caatinga (*Passiflora cincinnata*) e goiaba (*Psidium guajava*) (Farias, N., Soares, M, Gouveia, LWT - Food Science and Technology. 2016 71, 149 e 154; ANDRADE, R. H. C de, Monografia – UFPE 2017; Santos, E., Andrade, R., Gouveia, E. Food Bioscience. 2017 20, 56 – 61).

[009] Além disso, como o pH ácido é um dos principais fatores de estresse e consecutivamente morte dos probióticos durante o trânsito gastrointestinal, a presente invenção de patente objetivou tanto desenvolver um processo que

garantisse a capacidade do microrganismo de se manter viável em pH extremamente ácido por um longo intervalo de tempo, quanto proporcionar um aumento na resistência desse as condições gastrointestinais.

[010] Dessa forma, com o intuito de solucionar o problema dos índices de sobrevivência nas condições gastrointestinais e assim potencializar a sobrevivência para *L. rhamnosus* ATCC 7469 em sua forma livre, ou seja, sem o seu encapsulamento, foi desenvolvido um processo para a obtenção de células mais resistentes a partir da seleção em gradiente ácido em meio vegetal e posterior criação de uma bebida fermentada a partir das células selecionadas.

[011] Em comparação com as demais técnicas previamente citadas, a seleção em gradiente ácido apresenta algumas vantagens, em especial por se tratar de um processo simples que não necessita de uma mão de obra altamente especializada. Em adição, trata-se de um processo novo e que demanda baixo custo de investimento para reagentes e equipamentos. Além disso, a utilização da polpa de maracujá durante o processo garante que *L. rhamnosus* ATCC 7469 pode ser utilizado na elaboração de bebida baseada nessa matriz vegetal.

[012] Quando realizada a invenção na literatura de patentes, foi verificado que a utilização de maracujá para o desenvolvimento de bebidas probióticas já é conhecida. No documento de patente CN107668455 (A), os inventores relatam o desenvolvimento de uma bebida fermentada probiótica com *Bifidobacterium* e *Lactobacillus* à base de maracujá, açúcar e água. Outra patente, CN107279640 (A), também demonstra o desenvolvimento de uma bebida probiótica contendo maracujá, porém associada com outras fontes vegetais, como por exemplo maçã e chá verde.

[013] No entanto, diferentemente do realizado na patente atual, não foram encontrados até o momento relatos sobre a utilização de células probióticas previamente selecionada em gradiente ácido e em matriz vegetal, afim de potencializar a sobrevivência do probiótico a condições estressantes do sistema digestório.

### **OBJETIVO DA INVENÇÃO**

[014] Desenvolver um processo simples e eficiente para a obtenção de células mais resistentes as condições gastrointestinais a partir de gradiente ácido e polpa de maracujá. Além de realizar a produção de uma bebida fermentada de maracujá com as células obtidas na seleção ácida.

### **DESCRIÇÃO DAS FIGURAS**

[015] Para uma melhor compreensão do processo e obtenção da bebida funcional fermentada a partir das células selecionadas em gradiente ácido e em meio a base de maracujá será, a seguir, a título de ilustração apresentado de forma detalhada as Figuras 1 e 2:

[016] A Figura 1, revela de maneira ilustrativa, todas as etapas do processo para obtenção de células de *L. rhamnosus* ATCC 7469 mais resistentes as condições gastrointestinais em gradiente ácido e em meio à base de maracujá, e formulação da bebida funcional fermentada a partir das células selecionadas.

[017] A Figura 2 traz em si os resultados obtidos referente aos índices de sobrevivência nas condições simuladas do trato gastrointestinal para as células de *L. rhaminosus* ATCC 7469 antes e após seleção em gradiente ácido e meio à base de maracujá.

### **DESCRIÇÃO DA INVENÇÃO**

[018] A cultura comercial de *Lactobacillus rhamnosus* ATCC 7469 foi inicialmente reativada em meio seletivo para *Lactobacillus* (MRS – Man, Rogosa e Sharpe) durante 24 horas a 37 °C em estufa para cultura bacteriológica (LABOR). Subsequentemente as células crescidas em meio líquido foram semeadas em meio sólido MRS (54,3 g/L) e Ágar (20 g/L) e cultivadas novamente em estufa para cultura bacteriológica a 37 °C por 24 horas. Após esse período as células crescidas foram preservadas em glicerol 10% V/V a -20 °C em freezer (modelo FE 22, Electrolux) até posterior utilização, de acordo com a metodologia proposta por Chang & Liew, 2013 (Journal of Food Biochemistry).

2013 37 536–543).

[019] Para elaboração das bebidas utilizou-se polpa de maracujá na proporção de 55 % V/V. O pH das bebidas foram ajustados para  $6,00 \pm 0,2$ ,  $4,00 \pm 0,2$  ou  $2,00 \pm 0,2$  com NaOH (2M) ou HCl (2 M), conforme necessidade do processo, com o auxílio de pHmetro digital. Em seguida as bebidas foram pasteurizadas lentamente em banho Maria, durante 35 minutos a  $67 \pm 2$  °C, com posterior resfriamento em banho de gelo (FELLOWS, P.J. Food processing technology: principles and practice, Third Edition. Boca Raton: CRC Press, 2009; Farias, N., Soares, M, Gouveia, LWT - Food Science and Technology. 2016 71, 149 e 154; Santos, E., Andrade, R., Gouveia, E. Food Bioscience. 2017 20, 56 – 61; Clark, Dunlap, Madigan, Martinko. Microbiologia de Brock., Artimed, 2010), e em seguida foram congeladas a  $-20$  °C em freezer até o momento de sua utilização.

[020] Após o devido preparo e acondicionamento do microrganismo e das bebidas a serem utilizadas, foi iniciado o processo de seleção em gradiente ácido. Para uma melhor compreensão da invenção a Figura 1, que se encontra em anexo, demonstra uma representação esquemática das etapas do processo. Onde, (1), (2), (3), (4), (5), (6), (7) e (8) correspondem as etapas de reativação do microrganismo, submissão do microrganismo ao pH 6, submissão do microrganismo ao pH 4, submissão do microrganismo ao pH 2, cultivo do microrganismo em meio inclinado (MRS - 54,3 g/L; Agar – 20 g/L), preservação do microrganismo em glicerol (10% V/V), submissão das células selecionadas a simulação gastrointestinal e desenvolvimento da bebida funcional fermentada, nessa ordem. A simulação gastrointestinal foi realizada de acordo com a metodologia descrita com Santos et al. (Santos, E., Andrade, R., Gouveia, E. Food Bioscience. 2017 20, 56 – 61). Para que fique evidente, a invenção descrita na presente patente consiste em si no processo para a obtenção de células mais resistentes ao estresse gastrointestinal após a submissão sucessiva do microrganismo em pH 6, 4 e 2 em meio à base de maracujá e o desenvolvimento de uma bebida funcional fermentada a partir das células selecionadas.

[021] O processo de obtenção das células mais resistentes consiste inicialmente na reativação de 2 mL do microrganismo preservado em glicerol (10% V/V) em 25 mL de caldo MRS (54,3 g/L) a 37 °C durante 24 horas em estufa bacteriológica (Figura 1 (1)). Após esta etapa, foram transferidos 10 % V/V da suspensão microbiana para a bebida com pH ajustado para  $6,00 \pm 0,2$  e em seguida realizou-se a fermentação a 37 °C por 24 h (Figura 1 (2)). Após as 24 horas em pH 6 transferiu-se 10% V/V da suspensão celular para a próxima bebida cujo pH inicial foi ajustado para 4 (Figura 1 (3)), e sequencialmente o mesmo foi feito para o pH 2 (Figura 1 (4)). As fermentações realizadas em pH 4 e em pH 2 foram direcionadas para estufa bacteriológica durante 12 horas a 37 °C. Após as 12 horas em pH 2 as células sobreviventes no meio de fermentação foram cultivadas em meio inclinado MRS (54,3 g/L) e Ágar (20 g/L) a 37 °C. Prontamente após 24 horas em meio inclinado, as células foram ressuspensas em solução de glicerol 10% V/V e direcionadas ao freezer a -20 °C para posteriormente serem submetidas ao teste de simulação gástrica e intestinal.

[022] Afim de verificar a eficiência da seleção em gradiente ácido e meio à base de maracujá para *L. rhamnosus* ATCC 7469 foi realizado o teste de simulação gástrica e intestinal, tanto para células controle (C), ou seja, que não passaram pelo processo de seleção, quanto para células selecionadas consecutivamente do pH 6 para o pH 4 e pH 2, as quais forma denominadas de células seleção total (T). Um terceiro grupo também foi avaliado afim de determinar se a passagem pelo pH 4 realmente era necessário para obtenção das células mais resistentes. Nesse grupo as células passaram diretamente do pH 6 para o pH 2 e dessa forma, foram denominados de grupo seleção reduzida (R). As células do grupo R foram cultivadas, preservadas e reativadas seguindo o mesmo método das células do grupo T.

[023] Os valores da sobrevivência de *L. rhamnosus* para os três grupos (C, T e R) podem ser verificados em porcentagem na Figura 2. Os dados obtidos

demonstram que a seleção T promoveu aumento na sobrevivência microbiana após a simulação gastrointestinal quando comparado com as células do grupo C. A viabilidade das células após a simulação gastrointestinal no grupo C e T foi de 3,47 Log UFC / mL e 4,58 Log UFC / mL, respectivamente. Em 2015, Mathipa e Thantsha (Gut Pathogens. 2015 7-5) verificaram que a exposição previa a múltiplas condições de estresse (pH ácido, sais biliares e temperatura) teria o potencial de melhorar a sobrevivência de diferentes cepas de *Lactobacillus* em 1 Log CFU / mL, após a simulação gastrointestinal. A partir da presente patente foi verificado que exposição prévia ao gradiente ácido (Grupo T) em meio de maracujá resultou no mesmo aumento. Este é um resultado positivo porque demonstra que a pré-exposição em gradiente ácido pode ter tanto potencial quanto a pré-exposição a múltiplos fatores de estresse.

[024] Por outro lado, quando as células não passaram pelo pH 4 e foram transferidas diretamente do pH 6 para o pH 2 ocorreu diminuição na resistência do microrganismo para a simulação gastrointestinal, indicando assim que a mudança abrupta do pH 6 para o 2 exercem um efeito contrário do observada na seleção total. Dessa forma, não é aconselhável a realização da seleção reduzida para *L. rhamnosus* ATCC 7462 em meio à base de maracujá.

[025] Por fim, realizou-se a elaboração da bebida fermentada com as células selecionadas em gradiente ácido (Células do Grupo T). Para isso, 2 mL das células selecionadas, que haviam sido preservadas anteriormente em glicerol 10 % V/V, foram reativadas em 25 mL de MRS e direcionadas para estufa de crescimento durante 24 horas a 37 °C. Em seguida, após a etapa de reativação, 10 % V/V da suspensão microbiana foi transferida para a bebida à base de maracujá (55 % V/V) previamente pasteurizada. Após inoculação, a bebida foi acondicionada a 37 °C por 24 horas para assim poder ser consumida.

[026] A partir dos documentos revelados, ressalta-se que o desenvolvimento e aplicação do "PROCESSO DE SELEÇÃO DE *L. rhamnosus*

ATCC 7469 EM GRADIENTE ÁCIDO E MATRIZ VEGETAL PARA OBTENÇÃO DE CÉLULAS MAIS RESISTENTES AO TRATO GASTROINTESTINAL E DESENVOLVIMENTO DE UM PRODUTO A PARTIR DAS CÉLULAS SELECIONADAS” proposto nesse documento de patente possui potencial inovador, sendo assim atende os critérios de novidade, visto que, até o presente momento nenhum trabalho científico ou técnico compreendido no estado da técnica possui o desenvolvimento, obtenção e a aplicação do que é revelado no requerido. Além disso, é válido ressaltar que o presente pedido apresenta também outros critérios de patenteabilidade, como atividade inventiva e aplicação industrial, os quais são requisitos necessários para a concessão da patente requerida.

### **VANTAGENS DA INVENÇÃO**

[027] Dentre as vantagens e diferenciais apresentados pelo dito “PROCESSO DE SELEÇÃO DE *L. rhamnosus* ATCC 7469 EM GRADIENTE ÁCIDO E MATRIZ VEGETAL PARA OBTENÇÃO DE CÉLULAS MAIS RESISTENTES AO TRATO GASTROINTESTINAL E DESENVOLVIMENTO DE UM PRODUTO A PARTIR DAS CÉLULAS SELECIONADAS”, pode-se destacar como mais relevantes:

[028] De acordo com o método para obtenção de células mais resistentes as condições gastrointestinais, o processo é estável e prático, o investimento em equipamentos de produção e reagentes é baixo;

[029] O processo em questão é simples, sendo de fácil popularização e apresenta boas perspectivas para ser aplicado no mercado. Além disso, trata-se de um processo seguro e pode ser utilizado em escala industrial;

[030] O processo utiliza células livres, não havendo necessidade de encapsulação, fator este que o torna menos custoso e fácil de replicar;

[031] As células selecionadas já estão adaptadas para serem utilizadas em bebida à base de maracujá, visto que, o processo de seleção foi realizado na

mesma matriz utilizada para o desenvolvimento da bebida funcional fermentada;

[032] Em adição, as células obtidas após seleção em gradiente ácido apresentam resistência aumentada as condições de estresse do sistema digestivo, fator este que garante uma maior densidade de células capazes de alcançar o intestino e assim desempenhar sua função probiótica;

[033] Referindo-se a bebida probiótica fermentada gerada a partir da ação fermentativa das células selecionadas em gradiente ácido, está é uma boa opção para usuários que desejam consumir alimentos funcionais que não sejam baseados em matrizes lácteas, especialmente motivados por fatores como alergia e intolerância a laticínios;

[034] A bebida apresenta-se como alternativa para indivíduos que buscam um alimento nutricionalmente rico, saudável e natural;

[035] Trata-se de um alimento funcional, e por isso, além do aspecto nutricional seu consumo está associado a benefícios a saúde devido especialmente a presença do probiótico *L. rhamnosus* ATCC 7469;

[036] O produto pode assim ser caracterizado como uma bebida funcional fermentada à base de maracujá, contendo células livres de *L. rhamnosus* ATCC 7469 mais resistentes a condições gastrointestinais.

### Reivindicações

01. “PROCESSO DE SELEÇÃO DE *L. rhamnosus* ATCC 7469 EM GRADIENTE ÁCIDO E MATRIZ VEGETAL PARA OBTENÇÃO DE CÉLULAS MAIS RESISTENTES AO TRATO GASTROINTESTINAL” caracterizado por ser realizado com transferência sucessiva do microrganismo na proporção preferencial de 10 % V/V em meios à base de maracujá com pH ajustado para 6, 4 e 2.

02. “PROCESSO DE SELEÇÃO DE *L. rhamnosus* ATCC 7469 EM GRADIENTE ÁCIDO E MATRIZ VEGETAL PARA OBTENÇÃO DE CÉLULAS MAIS RESISTENTES AO TRATO GASTROINTESTINAL”, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado por ter a primeira etapa em pH 6 e ser realizado em estufa de crescimento a 37 °C durante 24 horas.

03. “PROCESSO DE SELEÇÃO DE *L. rhamnosus* ATCC 7469 EM GRADIENTE ÁCIDO E MATRIZ VEGETAL PARA OBTENÇÃO DE CÉLULAS MAIS RESISTENTES AO TRATO GASTROINTESTINAL”, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado por ter a segunda etapa do processo realizada em pH 4 e a terceira etapa em pH 2 e transcorrerem em um período de 12 horas em estufa de crescimento a 37 °C.

04. “PROCESSO DE SELEÇÃO DE *L. rhamnosus* ATCC 7469 EM GRADIENTE ÁCIDO E MATRIZ VEGETAL PARA OBTENÇÃO DE CÉLULAS MAIS RESISTENTES AO TRATO GASTROINTESTINAL”, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado por utilizar ácido clorídrico para realizar o ajuste do pH para 4 e 2 das bebidas.

05. “PROCESSO DE SELEÇÃO DE *L. rhamnosus* ATCC 7469 EM GRADIENTE ÁCIDO E MATRIZ VEGETAL PARA OBTENÇÃO DE CÉLULAS MAIS RESISTENTES AO TRATO GASTROINTESTINAL”, de acordo com a

reivindicação 1, caracterizado por recuperar as células através do cultivo dessas em meio MRS e Ágar após 12 horas em pH 2 e ressuspensão das células em solução de glicerol 10 % (V/V) com posterior congelamento das mesmas para a devida preservação.

06. “PROCESSO DE SELEÇÃO DE *L. rhamnosus* ATCC 7469 EM GRADIENTE ÁCIDO E MATRIZ VEGETAL PARA OBTENÇÃO DE CÉLULAS MAIS RESISTENTES AO TRATO GASTROINTESTINAL”, de acordo com as reivindicações 1 e 5, caracterizado por recuperar as células através da dispersão da suspensão celular previamente em meio à base de maracujá com pH 2 sobre o meio MRS Ágar com posterior direcionamento para estufa de crescimento a 37 °C durante 24 horas.

07. “PROCESSO DE SELEÇÃO DE *L. rhamnosus* ATCC 7469 EM GRADIENTE ÁCIDO E MATRIZ VEGETAL PARA OBTENÇÃO DE CÉLULAS MAIS RESISTENTES AO TRATO GASTROINTESTINAL”, de acordo com as reivindicações 1 e 5, caracterizado por, após cultivo das células selecionadas em MRS Ágar, ressuspensão dessas em 5 mL de solução de glicerol 10 % V/V.

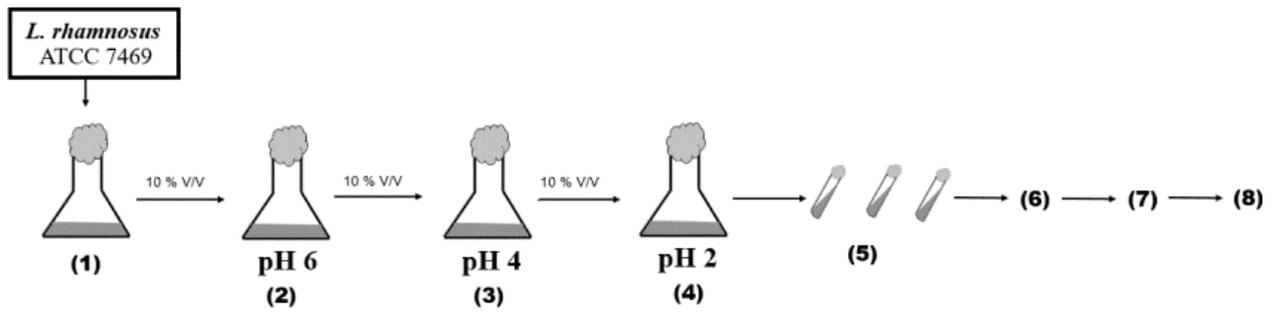
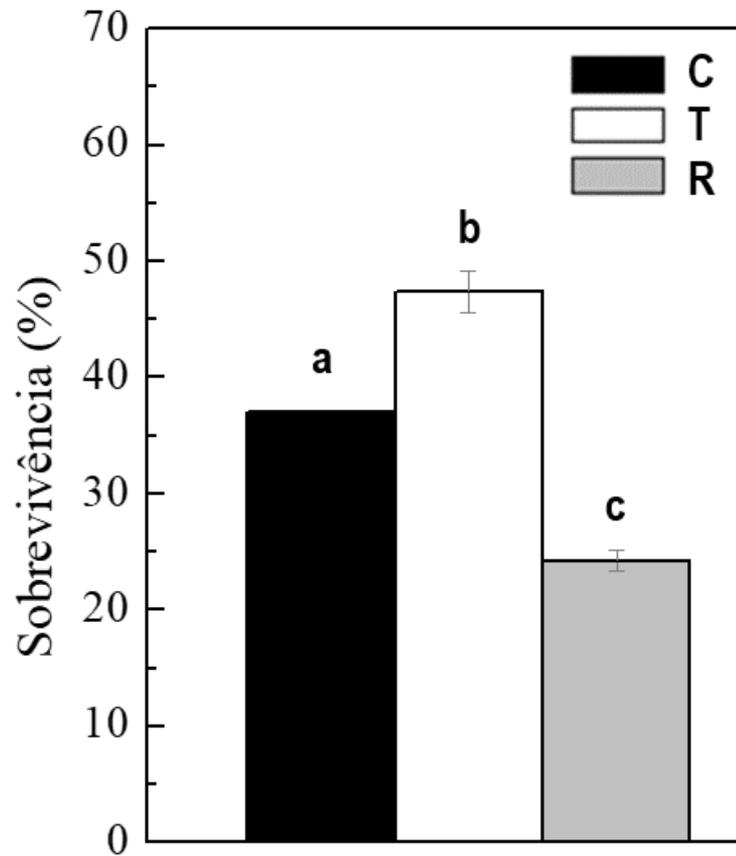
08. “PROCESSO DE SELEÇÃO DE *L. rhamnosus* ATCC 7469 EM GRADIENTE ÁCIDO E MATRIZ VEGETAL PARA OBTENÇÃO DE CÉLULAS MAIS RESISTENTES AO TRATO GASTROINTESTINAL”, de acordo com as reivindicações 1, 5 e 7 caracterizado por ser realizada a partição da suspensão celular em glicerol 10 %V/V de 1 em 1 mL em *eppendorffs* e posterior congelamento a -20 °C até ser utilizado.

09. “DESENVOLVIMENTO DE UM PRODUTO A PARTIR DAS CÉLULAS SELECIONADAS”, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado por utilizar as células previamente selecionadas em gradiente ácido e suco à base de maracujá contendo 55 % V/V de polpa.

10. “DESENVOLVIMENTO DE UM PRODUTO A PARTIR DAS CÉLULAS SELECIONADAS”, de acordo com a reivindicação 9, caracterizado por ser feito a reativação de 2 mL da suspensão celular em glicerol 10 % (V/V) em 25 mL de MRS por 24 horas a 37 °C.

11. “DESENVOLVIMENTO DE UM PRODUTO A PARTIR DAS CÉLULAS SELECIONADAS”, de acordo com as reivindicações 9 e 10, caracterizado pela transferência de preferencialmente 10 % (V/V) da suspensão celular em MRS para suco de maracujá contendo 55 % (V/V) de polpa.

12. “DESENVOLVIMENTO DE UM PRODUTO A PARTIR DAS CÉLULAS SELECIONADAS”, de acordo com as reivindicações 9, 10 e 11, caracterizado por passar 24 horas a 37 °C para realização da fermentação.

**Figuras****Figura 1****Figura 2**

**Resumo****PROCESSO DE SELEÇÃO DE *L. rhamnosus* ATCC 7469 EM GRADIENTE ÁCIDO E MATRIZ VEGETAL PARA OBTENÇÃO DE CÉLULAS MAIS RESISTENTES AO TRATO GASTROINTESTINAL E DESENVOLVIMENTO DE UM PRODUTO A PARTIR DAS CÉLULAS SELECIONADAS**

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