



UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
CENTRO DE TECNOLOGIA
DEPARTAMENTO DE ENGENHARIA QUÍMICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA QUÍMICA

RHONYELE MACIEL DA SILVA

**SUCOS FUNCIONAIS DE SAPOTA-DO-SOLIMÕES (*Quararibea cordata*
Vischer): DESENVOLVIMENTO, CARACTERIZAÇÃO E EFEITO NA
MICROBIOTA INTESTINAL**

FORTALEZA

2022

RHONYELE MACIEL DA SILVA

SUCOS FUNCIONAIS DE SAPOTA-DO-SOLIMÕES (*Quararibea cordata* Vischer):
DESENVOLVIMENTO, CARACTERIZAÇÃO E EFEITO NA MICROBIOTA
INTESTINAL

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial à obtenção do título de Doutora em Engenharia Química. Área de concentração: Processos químicos e Bioquímicos.

Orientador: Prof. Dr.^a Sueli Rodrigues

FORTALEZA

2022

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
Universidade Federal do Ceará
Sistema de Bibliotecas
Gerada automaticamente pelo módulo Catalog, mediante os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

S583s Silva, Rhoneyele Maciel da.

Sucos funcionais de sapota-do-Solimões (*Quararibea cordata* Vischer): desenvolvimento, caracterização e efeito na microbiota intestinal / Rhoneyele Maciel da Silva. – 2022.

141 f. : il. color.

Tese (doutorado) – Universidade Federal do Ceará, Centro de Tecnologia, Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química, Fortaleza, 2022.

Orientação: Prof. Dr. Sueli Rodrigues.

1. probiótico. 2. frutooligossacarídeos. 3. simbiótico. 4. digestão in vitro; . 5. microbiota intestinal. I. Título.

CDD 660

RHONYELE MACIEL DA SILVA

SUCOS FUNCIONAIS DE SAPOTA-DO-SOLIMÕES (*Quararibea cordata* Vischer):
DESENVOLVIMENTO, CARACTERIZAÇÃO E EFEITO NA MICROBIOTA
INTESTINAL

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química da Universidade Federal do Ceará, como requisito à obtenção do título de Doutora em Engenharia Química. Área de concentração: Processos químicos e Bioquímicos.

Orientador: Prof^ª. Dr^ª. Sueli Rodrigues

Aprovada em: 14/06/2022.

BANCA EXAMINADORA



Prof^ª. Dr^ª. Sueli Rodrigues (Orientadora)
Universidade Federal do Ceará (UFC)



Prof^ª. Dr^ª. Adriane Elisabete Antunes de Moraes
Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP)



Prof^ª. Dr^ª. Marciane Magnani
Universidade Federal da Paraíba (UFPB)



Prof^ª. Dr^ª. Maria Alice Zarur Coelho
Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ)



Prof^ª. Dr^ª. María José Frutos Fernández
Universidad Miguel Hernandez (UMH)

Aos meus sobrinhos Guilherme e Hariel.

AGRADECIMENTOS

À Fundação Cearense de Apoio ao Desenvolvimento Científico e Tecnológico (FUNCAP), pelo apoio financeiro de R\$ 2.200 durante esses 4 anos e 3 meses. Assim como, INCT- FT (Instituto Nacional de Frutos Tropicais) e as agências de fomento CAPES e CNPQ pelo suporte financeiro.

À minha orientadora Prof^ª. Dr^ª. Sueli Rodrigues, por permitir que eu realizasse meu sonho em trabalhar no laboratório de biotecnologia (LABIOTEC). Além de me proporcionar a atuação em diferentes áreas, que jamais imaginei trabalhar, mas me apaixonei por cada uma delas. Foram seis anos de muito aprendizado e admiração pela professora e orientadora que ela é. Principalmente durante a pandemia de COVID 19, com todo o cuidado e esforço para que pudéssemos retornar ao laboratório com segurança, foi extremamente admirável.

Ao Prof. Dr. Pedro Henrique Campelo (UFAM) que possibilitou o desenvolvimento desse trabalho a partir da doação da polpa de sapota-do-Solimões.

Às professoras, Dr^ª. Adriane Elisabete Antunes de Moraes (UNICAMP) e Dr^ª. Marciane Magnani (UFPB), que desde que assisti suas palestras nos congressos pensei em convidá-las para avaliar a minha tese. Felizmente, aceitaram o convite e deram colaborações valiosas para o trabalho.

À Prof^ª. Dr^ª. Maria Alice Zarur Coelho (UFRJ), que me acolheu em um novo projeto que será transformador na minha vida e aceitou participar da avaliação da tese.

À Prof^ª. Dr^ª. Maria Jose Frutos Fernandez (UMH), que eu admiro muito e sempre me ajudou quando precisei. Aceitou fazer parte da avaliação da tese.

Às professoras Cláudia, Suzana, Lucicléia e Daniele que fizeram parte da minha formação e me motivaram a querer ser uma pesquisadora.

Aos meus amigos que me escutaram e me ajudaram na execução dessa tese.

À minha mãe Isabel que é a minha maior incentivadora.

“Que seu alimento seja seu remédio e seu remédio seu alimento.”

(Hipócrates, 500 a.C)

“A vida pode ser difícil, principalmente, quando você tenta carregar tudo com você. Por isso, decida o que deve ser mantido e deixe o resto ir. Assim, sobrá mais espaço para o que realmente importa.” (Dr^a. Taylor Swift, 2022)

RESUMO

A sapota-do-Solimões da Amazônia produz um suco rico em nutrientes, fibras, ácido ascórbico e outros micronutrientes. O conteúdo em açúcares, e pH é favorável para o crescimento de bactérias probióticas possibilita seu uso como matriz para produção de sucos funcionais que podem favorecer o microbioma intestinal diminuindo o risco de disbiose. Com isso a fermentação desse suco com a cepa *Lacticaseibacillus casei* B-442 se torna viável para a produção de um suco probiótico. E com a adição de frutooligosacarídeos (FOS) pode ser produzido um simbiótico, relacionado ao aumento da viabilidade do probiótico diante de condições gastrointestinais. Com isso esse estudo desenvolveu um suco probiótico (SSP) e um simbiótico (SSS) de sapota-do-Solimões e avaliou a viabilidade por meio de digestão *in vitro* e durante o armazenamento de 30 dias a 4 °C. O SSS e SSP apresentaram boa resistência a digestão *in vitro* com contagem de aproximadamente 8 e 4 log UFC/mL, respectivamente, após 6h de digestão *in vitro*. A digestão *in vitro* com caldo MRS fermentado e o suco de sapota-do-Solimões com *L. casei* B-442 não fermentado obtiveram contagens menores demonstrando a capacidade dos sucos funcionais em proteger os probióticos. Durante o armazenamento, a taxa de sobrevivência do SSS caiu para 82%, enquanto o SSP caiu para 95%. No entanto, esses valores não afetaram a digestão *in vitro* após 30 dias de armazenamento a frio mantendo valores aproximadamente 8 e 4 log UFC/mL para SSS e SSP, respectivamente. Os compostos fenólicos aumentaram após a fermentação para SSS (140%) e após armazenamento para o SSP (120%). Os FOS favoreceram a maior viabilidade do SSS durante as condições gastrointestinais. No entanto, não foi consumido pela cepa de *L. casei* B-442 durante a fermentação ou armazenamento, preferindo glicose e sacarose no SSP e glicose, frutose e sacarose no SSS. A produção de ácidos graxos de cadeia curta (AGCC) foi maior para SSS se destacando acético, láctico e propiônico. Diante desses resultados o SSS foi submetido a fermentação colônica *in vitro* antes e após o armazenamento. O SSS promoveu um efeito positivo as diferentes microbiotas fecais prevalecendo os filos *Firmicutes*, *Bacteroidetes* e *Actinobacteria*. Os FOS aumentaram a abundância do gênero *Bifidobacterium*, no SSS0 e SSS30, prevalentes em microbiotas saudáveis. O aumento da do índice de alfa-diversidade Chao1 foi visto para o suco antes e após o armazenamento, mas não para diversidade com a diminuição do Shannon para SSS30 após a fermentação colônica. Os FOS foram totalmente consumidos pelas duas microbiotas fecais, mas no SSS30 48 h a frutose não foi totalmente consumida, devido a

uma menor quantidade de microrganismo metabolizadores de frutose como o *Streptococcus*. Os AGCC aumentaram para as duas microbiotas, mas o ácido cítrico reduziu 8 vezes seu valor durante fermentação colônica em SSS30. A bioacessibilidade do ácido ascórbico demonstrou sua instabilidade em condições entéricas, além do favorecimento da abundância de *Actinobacteria*. Portanto, o suco de sapota-do-Solimões é uma matriz viável para produção de sucos funcionais contendo probióticos e prebióticos capazes de causar mudanças benéficas na microbiota intestinal humana com possíveis benefícios a saúde.

Palavras-chave: Probiótico; Simbiótico; Digestão *in vitro*; Frutooligossacarídeos; Microbiota intestinal.

ABSTRACT

The sapota-do-Solimões from the Amazonian produces a juice rich in nutrients, fiber, ascorbic acid and other micronutrients. The sugar content and pH are favorable for the growth of probiotic bacteria, allowing its use as a matrix for the production of functional juices that can favor the intestinal microbiome, reducing the risk of dysbiosis. Thus, the fermentation of this juice by the strain *Lactocaseibacillus casei* B-442 becomes feasible for the production of a probiotic juice. Moreover, the addition of fructooligosaccharides (FOS) a synbiotic can be produced, which can increase probiotic viability under gastrointestinal conditions. Therefore, this study developed a probiotic juice (SSP) and a synbiotic juice (SSS) of sapota-do-Solimões and evaluated the viability through *in vitro* digestion and during storage for 30 days at 4 °C. SSS and SSP showed noteworthy survival through *in vitro* digestion with counts of approximately 8 and 4 log CFU/mL, respectively, after 6h of *in vitro* digestion. *In vitro* digestion with fermented MRS broth and sapota-do-Solimões juice with *L. casei* B-442 non-fermented presented lower counts, demonstrating the ability of the functional juices to protect probiotics cells. During storage, the SSS survival rate dropped to 82% while the SSP dropped to 95%. However, these values did not affect *in vitro* digestion after 30 days of cold storage, maintaining values approximately 8 and 4 log CFU/mL for SSS and SSP, respectively. Phenolic compounds increased after fermentation for SSS (140%) and after storage for SSP (120%). FOS favored greater SSS viability during gastrointestinal conditions. However, it was not consumed by *L. casei* B-442 during fermentation or storage period, preferring glucose and sucrose in the SSP and glucose, fructose and sucrose in the SSS. The production of short chain fatty acids (SCFA) was higher for SSS, highlighting acetic, lactic and propionic. From these results, the SSS was subjected to colonic fermentation *in vitro* before and after storage. The SSS modulated the different fecal microbiota, prevailing the phyla *Firmicutes*, *Proteobacteria*, *Bacteroidetes* and *Actinobacteria*. FOS increased the abundance of the genus *Bifidobacterium*, in SSS0 and SSS30, prevalent in healthy microbiota. The increase in the alpha-diversity index Chao1 was seen for the juice before and after storage, but not for diversity with the decrease from Shannon for SSS30 after colonic fermentation. FOS were fully consumed by the two fecal microbiotas, but at SSS30 48 h fructose was not fully consumed, due to a lower abundance of fructose-metabolizing microorganisms such as *Streptococcus*. SCFA increased for both microbiotas, but citric acid reduced its value 8-fold during colonic fermentation in SSS30. The bioaccessibility of ascorbic acid demonstrated its instability under enteric conditions,

however may favored the abundance of *Actinobacteria*. Therefore, sapota-do-Solimões juice is a viable matrix for the production of functional juices containing probiotics and prebiotics capable of causing beneficial changes in the human intestinal microbiota with possible health benefits.

Palavras-chave: Probiotic; Synbiotic; *In vitro* digestion; Fructooligosaccharides; Gut microbiota.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1- Mecanismo dos frutooligossacarídeos para promover benefícios à saúde	38
Figura 2- Sapota-do-Solimões (<i>Quararibea cordata</i> Vischer) de Goiânia Brasil. A- o fruto na árvore, B- a polpa do fruto e C- suco da fruta °Brix 2	43
Figura 3- Viabilidade do <i>L. casei</i> B-442 nos sucos funcionais de sapota-do-Solimões durante digestão <i>in vitro</i> após armazenamento. Suco de sapota-do-Solimões probiótico (SSP) e suco de sapota-do-Solimões simbiótico (SSS)	70
Figura 4- Concentração de açúcares dos sucos funcionais de sapota-do-Solimões durante os 30 dias de armazenamento (4 °C). Suco de sapota-do-Solimões <i>in natura</i> (A), suco de sapota-do-Solimões probiótico-SSP (B) e suco de sapota-do-Solimões simbiótico-SSS (C)	73
Figura 5 - Frutooligossacarídeos do suco simbiótico de sapota-do-Solimões durante digestão <i>in vitro</i> e antes e após armazenamento (4 °C). Suco de sapota-do-Solimões probiótico (SSP) e suco de sapota-do-Solimões simbiótico (SSS)	76
Figura 6 - Concentração relativa dos graus de polimerização dos frutooligossacarídeos do suco simbiótico de sapota-do-Solimões durante digestão <i>in vitro</i> e antes e após armazenamento (4 °C). A- Suco de sapota-do-Solimões simbiótico (SSS0) e B- suco de sapota-do-Solimões simbiótico após armazenamento (SSS30)	77
Figura 7- Concentração de ácidos orgânicos e ácidos graxos de cadeia curta dos sucos funcionais de sapota-do-Solimões durante 30 dias de armazenamento (4 °C). Suco de sapota-do-Solimões probiótico SSP e suco de sapota-do-Solimões simbiótico SSS	80
Figura 8 - Concentração relativa dos fenólicos totais nos sucos funcionais de sapota-do-Solimões durante armazenamento (4 °C). Suco de sapota-do-Solimões <i>in natura</i> (SSI), Suco de sapota-do-Solimões probiótico (SSP) e suco de sapota-do-Solimões simbiótico (SSS)	83
Figura 9- Bioacessibilidade do ácido ascórbico nos sucos funcionais de sapota-do-Solimões durante digestão <i>in vitro</i> e armazenamento (4 °C). A- Suco de sapota-do-Solimões <i>in natura</i> (SSI), B- Suco de sapota-do-Solimões probiótico (SSP) e C suco de sapota-do-Solimões simbiótico (SSS)	85

Figura 10 – Abundância relativa dos filos identificados durante a fermentação colônica do suco simbiótico de sapota-do-Solimões antes e após armazenamento a 4 °C. Suco de sapota-do-Solimões simbiótico (SSS0) e suco de sapota-do-Solimões simbiótico após 30 dias de armazenamento (SSS30)	88
Figura 11- Identificação dos gêneros com maior abundância durante a fermentação colônica do suco simbiótico de sapota-do-Solimões antes e após armazenamento a 4 °C. Suco de sapota-do-Solimões simbiótico (SSS0) e suco de sapota-do-Solimões simbiótico após 30 dias de armazenamento (SSS30)	89
Figura 12- Parâmetros para a avaliação da alfa-diversidade da microbiota intestinal durante fermentação colônica do suco simbiótico de sapota-do-Solimões antes e após armazenamento a 4 °C. Suco de sapota-do-Solimões simbiótico (SSS0) e suco de sapota-do-Solimões simbiótico após 30 dias de armazenamento (SSS30)	91
Figura 13- PCA biplot (loadings e escores) das espécies durante a fermentação colônica do suco simbiótico de sapota-do-Solimões antes e após armazenamento a 4 °C. A- Suco de sapota-do-Solimões simbiótico (SSS0) e B- suco de sapota-do-Solimões simbiótico após 30 dias de armazenamento (SSS30)	92
Figura 14- Concentração de açúcares do suco simbiótico de sapota-do-Solimões durante fermentação colônica e antes e após 30 dias de armazenamento a 4 °C. A- Suco de sapota-do-Solimões simbiótico (SSS0) e B- suco de sapota-do-Solimões simbiótico após 30 dias de armazenamento (SSS30)	94
Figura 15- Concentração de ácidos orgânicos e ácidos graxos de cadeia curta do suco simbiótico de sapota-do-Solimões durante fermentação colônica e antes e após 30 dias de armazenamento a 4 °C. Suco de sapota-do-Solimões simbiótico (SSS0) e suco de sapota-do-Solimões simbiótico após 30 dias de armazenamento (SSS30)	96
Figura 16- Concentração relativa de frutooligossacarídeos do suco simbiótico de sapota-do-Solimões durante fermentação colônica e antes e após 30 dias de armazenamento. Suco de sapota-do-Solimões simbiótico (SSS0) e suco de sapota-do-Solimões simbiótico após 30 dias de armazenamento (SSS30)	98
Figura 17- Bioacessibilidade do ácido ascórbico no suco de sapota-do-Solimões simbiótico antes e após 30 dias de armazenamento (4 °C). Suco de sapota-do-Solimões	

simbiótico (SSS0) e suco de sapota-do-Solimões simbiótico após 30 dias de armazenamento (SSS30)..... 99

Figura 18 – Placas com colônias de *Lacticaseibacillus casei* B-442 fermentado em caldo MRS e em suco de sapota-do-Solimões *in natura* 134

LISTA DE TABELAS

Tabela 1- Trabalhos publicados com palavras-chave <i>Quararibea cordata</i> e <i>Matisia cordata</i>	44
Tabela 2- Composição centesimal da polpa da sapota-do-Solimões.....	47
Tabela 3- Composição de ácidos graxos da polpa de sapota-do-Solimões em mg/100 g	49
Tabela 4- Identificação dos sucos funcionais de sapota-do-Solimões	53
Tabela 5- Viabilidade do probiótico <i>L. casei</i> B-442 após fermentação (15 h; 37 °C) em diferentes matrizes.....	62
Tabela 6- Viabilidade do probiótico <i>L. casei</i> B-442 durante a digestão simulada in vitro em diferentes matrizes	64
Tabela 7- Parâmetros físico-químicos e taxa de sobrevivência do <i>L. casei</i> B-442 nos sucos funcionais de sapota-do-Solimões durante o armazenamento.....	66
Tabela 8 - Parâmetros de cor dos sucos funcionais de sapota-do-Solimões durante o armazenamento a 4 °C.....	68
Tabela 9 - Plano de trabalho	138

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	20
2	REVISÃO	22
2.1	Probióticos	22
2.1.1	<i>Mecanismos de resposta ao estresse das Lactobacillaceae</i>.....	25
2.1.1.1	pH	26
2.1.1.2	Pressão osmótica.....	28
2.1.1.3	Sais biliares	29
2.1.1.4	Reações oxidativas.....	30
2.1.1.5	Armazenamento	31
2.2	<i>Lacticaseibacillus casei</i>	32
2.3	Frutooligossacarídeos	36
2.4	Simbióticos	39
2.5	Sapota-do-Solimões (<i>Quararibea cordata</i> Vischer).....	42
3	OBJETIVOS	51
3.1	Objetivo geral	51
3.2	Objetivo específico	51
4	MATERIAL E MÉTODOS	52
4.1	Suco de sapota-do-Solimões	52
4.2	Preparo do inóculo <i>Lacticaseibacillus casei</i> B-442	52
4.3	Fermentação dos sucos funcionais de sapota-do-Solimões.....	52
4.4	Determinação da viabilidade.....	53

4.5	Armazenamento a 4 °C	54
4.6	Sobrevivência do <i>L. casei</i> B-442 em diferentes matrizes através de digestão <i>in vitro</i>	54
4.7	Fermentação colônica	55
4.7.1	<i>Aspectos Éticos</i>	55
4.7.2	<i>Fermentação colônica do suco de sapota-do-Solimões simbiótico</i>	55
4.8	Análise do DNA da microbiota intestinal	56
4.9	Alfa diversidade.....	57
4.10	Análise por cromatografia líquida de alto desempenho	58
4.10.1	<i>Preparo das amostras</i>	58
4.10.2	<i>Determinação de ácidos orgânicos e ácidos graxos</i>	58
4.10.3	<i>Determinação dos açúcares</i>	58
4.11	Avaliação por densitometria do grau de polimerização dos frutooligossacarídeos.....	59
4.12	Determinação de fenólicos totais	60
4.13	Bioacessibilidade do ácido ascórbico.....	60
4.14	Parâmetros de cor	61
4.15	Análises estatísticas	61
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	62
5.1	Viabilidade do <i>L. casei</i> B-442 em diferentes matrizes	62
5.2	Viabilidade do <i>L. casei</i> B-442 em diferentes matrizes durante digestão <i>in vitro</i>	63

5.3	Sobrevivência do <i>L. casei</i> B-442 nos sucos funcionais de sapota-do-Solimões durante armazenamento a frio (4 °C)	65
5.4	Parâmetros de cor nos sucos funcionais de sapota-do-Solimões durante o armazenamento a frio (4 °C)	67
5.5	Viabilidade do <i>L. casei</i> B-442 nos sucos funcionais de sapota-do-Solimões durante digestão <i>in vitro</i> após armazenamento a frio (4 °C)	69
5.6	Concentração dos açúcares nos sucos funcionais de sapota-do-Solimões durante o armazenamento a frio (4 °C)	72
5.7	Concentração dos frutooligossacarídeos durante digestão <i>in vitro</i> do suco simbiótico de sapota-do-Solimões durante o armazenamento a frio (4 °C)	75
5.8	Concentração de ácidos orgânicos dos sucos funcionais de sapota-do-Solimões durante armazenamento a frio (4 °C)	78
5.9	Concentração dos fenólicos totais nos sucos funcionais de sapota-do-Solimões durante armazenamento a frio (4 °C)	82
5.10	Bioacessibilidade do ácido ascórbico nos sucos funcionais de sapota-do-Solimões durante digestão <i>in vitro</i> e armazenamento a frio (4 °C)	84
5.11	Caracterização da microbiota intestinal após fermentação colônica do suco simbiótico de sapota-do-Solimões antes e após armazenamento a frio (4 °C)	87
5.12	Concentração de açúcares durante fermentação colônica do suco simbiótico de sapota-do-Solimões antes e após armazenamento a frio (4 °C)	93
5.13	Concentração de ácidos orgânicos durante fermentação colônica do suco simbiótico de sapota-do-Solimões antes e após armazenamento a frio (4 °C)	94
5.14	Concentração de frutooligossacarídeos durante fermentação colônica do suco simbiótico de sapota-do-Solimões antes e após armazenamento a frio (4 °C)	97
5.15	Bioacessibilidade do ácido ascórbico após fermentação colônica do suco simbiótico de sapota-do-Solimões antes e após armazenamento a frio (4 °C)	98

6 CONCLUSÃO.....	100
REFERÊNCIA.....	102
APÊNDICE A - Avaliação da contagem de viáveis em suco de sapota-do-Solimões <i>in natura</i>.....	134
APÊNDICE B - Termo de consentimento livre e esclarecido para estudo da microbiota intestinal.....	135
APÊNDICE C - Projeto para prorrogação da bolsa de doutorado FUNCAP-CE..	137

1 INTRODUÇÃO

O fruto Amazônico, sapota-do-Solimões (*Quararibea cordata* Vischer) possui uma variedade compostos como vitaminas, carotenoides, minerais, fibras e carboidratos que podem ser usados como substrato por microrganismos probióticos e outros microrganismos da microbiota intestinal (ELSHAHED *et al.*, 2020; MONTEIRO *et al.*, 2018c; SILVA *et al.*, 2022). Essa variedade de compostos bioativos pode favorecer a saúde através da modulação da microbiota intestinal, reduzindo os microrganismos nocivos (BRASIL *et al.*, 2019; WANG *et al.*, 2021a). Além disso, o interesse em alimentos prontos para consumo é uma tendência crescente devido a busca por hábitos mais saudáveis, principalmente, após a pandemia do COVID-19 que impulsionou o crescimento do mercado de bebidas funcionais, o qual pode chegar a US\$ 200 milhões até 2030 (ALLIED MARKET RESEARCH, 2021; ANTUNES *et al.*, 2020; PIMENTEL *et al.*, 2019).

Os probióticos são "microrganismos vivos, que quando administrados em quantidades adequadas conferem benefícios a saúde do hospedeiro". No entanto, para chegar até o intestino as células probióticas têm que suportar condições adversas principalmente durante o processo digestivo, incluindo pH, pressão osmótica, estresse oxidativo (Collado; Vinderola; Salminen, 2019; Guan; Liu, 2020). Além disso, manter a viabilidade das células probióticas durante o armazenamento entre 6-7 log UFC/mL. Para superar todos os obstáculos as células probióticas possuem mecanismos que envolvem bomba de prótons, modulação de membrana, produção de exopolissacarídeos entre outros (HILL *et al.*, 2018; VALERO-CASES *et al.*, 2020). Por outro lado, os componentes alimentares também podem desempenhar um papel fundamental na defesa celular probiótica, uma vez que lipídios, sólidos solúveis, açúcar, compostos bioativos, fibras dietéticas e até mesmo a capacidade tamponante podem mitigar o efeito nocivo contra a célula probiótica (LARSEN *et al.*, 2018; MARTINEZ *et al.*, 2011; SOARES *et al.*, 2019).

Os sucos simbióticos também desempenham um papel importante no mercado de bebidas funcionais porque combinam os efeitos de substratos fermentáveis (prebióticos) e microrganismos vivos (probióticos) para conferir benefícios à saúde (CUNNINGHAM *et al.*, 2021b). O consumo de simbióticos foi relacionado à diminuição da disbiose e à melhora da função da barreira intestinal levando ao alívio do risco/ou

sintomas de alergia, diabetes, síndrome metabólica, transtorno do espectro autista e outras doenças relacionadas ao intestino (DUQUE *et al.*, 2021; QI *et al.*, 2022; SANGOUNI; GHAVAMZADEH, 2019). A produção de sucos simbióticos com frutooligosacarídeos prebióticos (FOS) melhora os benefícios para a saúde aumentando a sobrevivência do probiótico durante condições gastrointestinais (GIT) (variação de pH, sais biliares e enzimas digestivas), aumentando a produção de ácidos graxos de cadeia curta (AGCC) e promovendo o equilíbrio da microbiota intestinal (CHENG *et al.*, 2020; FREIRE; RAMOS; SCHWAN, 2017; MACIEL DA SILVA; HENRIQUE CAMPELO; RODRIGUES, 2022; TANDON *et al.*, 2019; TULUMOĞLU; ERDEM; SIMŞEK, 2018). Além disso, bactérias do gênero *Lactobacillus* como *Lactobacillus casei* B-442 (*Lactobacillus casei* B-442) são amplamente utilizadas na fermentação de suco de frutas para aumentar o sabor, e conteúdo de compostos bioativos (COSTA *et al.*, 2013b; LEITE *et al.*, 2021b; MACIEL DA SILVA; HENRIQUE CAMPELO; RODRIGUES, 2022; PEREIRA *et al.*, 2013a).

No entanto, uma etapa importante para o estudo de sucos funcionais, probióticos e simbióticos, é a avaliação da interação com a microbiota intestinal. Pois trata-se de um sistema complexo composto por uma grande diversidade de microrganismos que desempenham funções diferentes e sua modulação está diretamente associada aos benefícios à saúde (LIU *et al.*, 2017). A microbiota intestinal humana é caracterizada pela alta abundância de dois filos *Bacteroidetes* e *Firmicutes*, mas também pode apresentar *Proteobacteria*, *Actinobacteria*, *Fusobacteria* e *Verrucomicrobia* (DÍAZ-GARCÍA; FLORES-MEDINA; SORIANO-BECERRIL, 2019). Alguns estudos vêm destacando a diminuição da razão *Firmicutes/Bacteroidetes* com a regulação de lipídios, ácido biliar e metabolismo do açúcar no hospedeiro (AYIMBILA *et al.*, 2022; WANG *et al.*, 2021a). Além disso, a ingestão de FOS pode afetar positivamente a microbiota intestinal aumentando a abundância de gêneros benéficos como *Bifidobacterium*, *Blautia* e *Coprococcus* (MAO *et al.*, 2018).

Portanto, este estudo traz o suco de sapota-do-Solimões como uma nova matriz para a produção de sucos funcionais probiótico e simbiótico. Assim, os sucos funcionais serão desenvolvidos e avaliados quanto a concentração de compostos fenólicos, viabilidade do *L. casei* B-442 durante digestão *in vitro*, teor de açúcares, AGCC, consumo de FOS e a bioacessibilidade de ácido ascórbico. Além de estudar o efeito do suco simbiótico na composição da microbiota intestinal humana.

2 REVISÃO

2.1 Probióticos

Em 2002, a FAO (Organização das Nações Unidas para a Alimentação e a Agricultura) definiu os probióticos como microrganismos vivos que, quando administrados em quantidades adequadas, conferem um benefício à saúde do hospedeiro. A definição foi mantida e atualmente utilizada de acordo com a Associação Científica Internacional de Probióticos e Prebióticos (ISAPP) (SWANSON *et al.*, 2020). Os probióticos funcionam como ativadores imunes direcionados a células procarióticas e eucarióticas, melhorando o sistema imunológico, através da modulação de cepas endógenas, proteção da barreira do trato intestinal, regulação do sistema imunológico, influência sobre aferentes vagais e manutenção da homeostase (GAO *et al.*, 2022).

A maioria dos probióticos são lactobacilli, bifidobacteria e outras bactérias ácido láctica (BAL) (CUNNINGHAM *et al.*, 2021a). Em 2020 bactérias do gênero *Lactobacillus* (261 espécies) foram divididas em 25 novos gêneros devido a diversidade fenotípica, ecológica e genotípica. São eles: *Lactobacillus*, *Paralactobacillus*, *Holzapfelia*, *Amylolactobacillus*, *Bombilactobacillus*, *Companilactobacillus*, *Lapidilactobacillus*, *Agrilactobacillus*, *Schleiferilactobacillus*, *Loigolactobacillus*, *Lacticaseibacillus*, *Latilactobacillus*, *Dellaglioia*, *Liquorilactobacillus*, *Ligilactobacillus*, *Lactiplantibacillus*, *Furfurilactobacillus*, *Paucilactobacillus*, *Limosilactobacillus*, *Fructilactobacillus*, *Acetilactobacillus*, *Apilactobacillus*, *Levilactobacillus*, *Secundilactobacillus* e *Lentilactobacillus* (ZHENG *et al.*, 2020). Além disso, uma gama de microrganismos do microbioma humano vem sendo caracterizados apresentando potenciais benefícios a saúde sendo considerados como a próxima geração de probióticos. Entre os microrganismos estão *Faecalibacterium prausnitzii*, *Bacteroides* spp., *Roseburia intestinalis*, *Eubacterium* spp., e *Akkermansia muciniphila* (CUNNINGHAM *et al.*, 2021b). Porém, as alegações potenciais de saúde devem ser comprovadas por estudos rigorosos e bem planejados em animais e seres humanos.

As BAL são geralmente reconhecidas como seguras (GRAS) e residentes transitórios do intestino humano, adaptando-se às condições do intestino e persistindo por vários dias ou semanas após o consumo (YIN *et al.*, 2014). As cepas de BAL podem ser classificadas como homofermentativas ou heterofermentativa. Os microrganismos

homofermentativos usam hexoses através da glicólise para formar 2 mol de ácido láctico e 2 mol de ATP a partir de uma molécula de glicose. Enquanto, os heterofermentativos convertem quantidades equimolares de ácido láctico, acetato ou etanol, e CO₂, atingindo 1 mol de ATP (BASSO *et al.*, 2014). Durante o metabolismo dos açúcares, as cepas de BAL produzem diferentes metabólitos, incluindo os ácidos graxos de cadeia curta (AGCC) butírico, propiônico e isobutírico, que desempenham um papel importante como fonte de carbono para o microbioma intestinal do hospedeiro. Esses AGCC têm de 1-6 átomos de carbono na cadeia alifática, sendo ramificados ou linear (MARKOWIAK-KOPEĆ; ŚLIŻEWSKA, 2020).

Os probióticos têm um papel fundamental como alimento funcional devido à sua atividade biológica. No entanto, os benefícios para a saúde promovidos pelas bactérias probióticas dependem da contagem de células vivas, que devem ser mais de 6 log UFC/mL (ABDEL-HAMID *et al.*, 2019). A ingestão regular de probióticos pode modular o microbioma intestinal reestabelecendo homeostase intestinal e prevenindo muitas doenças (MARKOWIAK-KOPEĆ; ŚLIŻEWSKA, 2020). No entanto, o consumo e os atributos funcionais dos probióticos são influenciados por diferentes fatores como dieta, idade, medicação e condições de saúde que acarretam em mudanças drásticas na microbiota intestinal (YIN *et al.*, 2014). Além disso, a habilidade dos probióticos para melhorar a imunidade humana vem sendo destaque na mitigação dos sintomas do COVID-19 (Coronavírus, SARS-COV-2). O uso de suplementação probiótica para prevenir ou tratar infecções respiratórias reforça os benefícios dos probióticos na redução dos sintomas do COVID-19 (OLAIMAT *et al.*, 2020). Pois a ingestão regular de probióticos pode aumentar a imunidade da mucosa e diminuir a inflamação intestinal, levando a infecções menos graves (ANTUNES *et al.*, 2020).

As indústrias que processam produtos probióticos fornecem um ambiente adequado para as células aumentarem suas taxas de sobrevivência através das condições adversas dos tratos gastrointestinais. As cepas iniciais no processo industrial são geralmente usadas no final da fase exponencial ou na fase de crescimento estacionário devido a altas densidades celulares (WANG *et al.*, 2012). É padronizado na indústria de alimentos e bebidas as células viáveis mínimas de 6 a 7 log UFC/g ou mL (BEHERA; PANDA, 2020). No intestino, a sobrevivência e a residência de probióticos podem ser influenciadas pela matriz utilizada como portador, e pela dose de probióticos (VALERO-

CASES *et al.*, 2020). A interação entre matriz alimentar e a cepa probiótica afeta sua viabilidade e estabilidade, portanto, diferentes fatores extrínsecos (temperatura) e intrínseco (nutrientes, pH, sólidos solúveis, acidez e potencial redox) devem ser controlados para evitar a morte celular (AFZAAL *et al.*, 2020).

Mundialmente, o leite é um alimento popular o que aumenta sua aceitabilidade como matriz probiótica. O consumo de probióticos em matriz láctea garante sua viabilidade ao longo da vida útil do produto e diante das condições adversas no trato gastrointestinal. Os produtos lácteos fermentados foram um dos primeiros alimentos funcionais considerados pelo mercado de alimentos funcionais (DA COSTA *et al.*, 2017). A atividade proteolítica em relação à proteína do leite das cepas de probióticos permite a produção de peptídeos bioativos que promovem atividade antioxidante e ACE-inibitória (ABDEL-HAMID *et al.*, 2019). Atualmente, o iogurte ainda é o principal alimento probiótico, sendo preparado através da fermentação de BAL (BEHERA; PANDA, 2020). No entanto, o leite tem componentes alergênicos que provocam danos à saúde de quase 10% da população mundial (DIMASSI *et al.*, 2020). Além disso, os laticínios não agradam alguns consumidores devido ao maior teor de gordura e colesterol (BEHERA; PANDA, 2020). A tendência atual do vegetarianismo também aumenta a necessidade de produtos não lácteos para atenderem à demanda por alimentos probióticos não lácteos.

Portanto, as matrizes não lácteas vêm demonstrando sua viabilidade como matriz para probióticos. Sucos de frutas são os mais proeminentes entre as alternativas devido à variedade de compostos bioativos, minerais, vitaminas e, principalmente, teor de açúcar a ser usado como fonte de carbono. A produção de suco de frutas probióticos se dá pela adição da cepa probiótica ou através de processos fermentativos. A primeira opção é interessante que seja usada com cepas resistentes a acidez ou com células imobilizadas. *L. plantarum* CNPC003 e *L. casei* BGP93 adicionados em suco misto de morango, banana e juçara (*Euterpi eudulis*) mostrou que *L. plantarum* CNPC003 foi mais resistente às condições gastrointestinais. A letalidade foi inferior a 2 log UFC/mL por 30 dias (RIBEIRO *et al.*, 2020). No entanto, durante a fermentação, a produção de ácidos orgânicos pode aumentar a sobrevivência das BAL devido a adaptação às condições ácidas (PEREIRA *et al.*, 2017a). Assim, diferentes sucos de frutas promoveram o crescimento celular de probióticos sem a adição de qualquer suplementação, incluindo

suco de romã, laranja, lichia, caju entre outros (MIRANDA *et al.*, 2019; MUSTAFA *et al.*, 2020; PEREIRA; MACIEL; RODRIGUES, 2011; WEN *et al.*, 2020).

Os probióticos existem em todo o trato intestinal humano, sendo mais ativos no cólon. Porém, as células devem sobreviver às condições ácida do estômago para aderir ao epitélio intestinal e exercer suas propriedades benéficas. Para isso a capacidade de hidrofobicidade e auto agregação dos probióticos são responsáveis por essa capacidade de aderência (VALERO-CASES *et al.*, 2020). Além disso, a variedade de compostos antimicrobianos aumenta sua eficácia como biopreservador, dentre eles ácido lático, ácido acético, ácido fenil-lático, ácidos graxos, compostos proteináceos, dipeptídeos cíclicos, bacteriocinas e peróxido de hidrogênio (ABOULOIFA *et al.*, 2021). A síntese de metabólitos secundários como ácido lático e exopolissacarídeos está relacionada à capacidade das cepas de BAL sobreviverem em condições adversas como pH gástrico e enzimas digestivas, mantendo sua viabilidade e aumentando a viscosidade do meio (VAMANU, 2017).

A taxa de sobrevivência durante o processamento e armazenamento de produtos probióticos depende das cepas e dos componentes da matriz alimentar que podem promover alterações no pH, oxigênio e nutrientes (CASTELLANOS FUENTES *et al.*, 2020). Além disso, a adição de prebiótico pode aumentar a sobrevivência celular devido à proteção física contra condições adversas gastrointestinais. Pectina tem o potencial de proteger bactérias probióticas durante o processo de digestão. O efeito benéfico foi observado para as pectinas com alto grau de metoxilação, indicando que o ácido poligalacturônico da sua estrutura é essencial para a proteção bacteriana. Alguns dos mecanismos propostos foram forças eletrostáticas devido à natureza aniônica das pectinas e ao efeito estérico promovido pelos carboidratos neutros nas cadeias laterais de pectina (LARSEN *et al.*, 2018). As células probióticas também podem melhorar sua sobrevivência mitigando as condições adversas durante o armazenamento e o ambiente gastrointestinal através de mecanismos de resposta ao estresse.

2.1.1 Mecanismos de resposta ao estresse das *Lactobacillaceae*

As bactérias da família *Lactobacillaceae* possuem mecanismos de defesa contra condições adversas que mitigam os danos celulares permitindo a sobrevivência

celular durante o armazenamento e o processo digestivo. Sob condições de estresse, o metabolismo celular desacelera alterando o crescimento e o estado celular (viável, viável, mas não cultivável e inviável). Em resposta, as células podem mudar as vias metabólicas para outras fontes de carbono, regular as proteínas chaperonas, catabolizar aminoácidos e alterar a membrana. Essas adaptações metabólicas são cruciais, porque levam à produção de energia, diminuindo o nível de estresse para os microrganismos. O que pode causar condições adversas a sobrevivência das *Lactobacillaceae* é variação de pH, sais biliares, enzimas digestivas, temperatura, reações oxidativas, pressão osmótica e armazenamento (HILL *et al.*, 2018; REALE *et al.*, 2015). A ativação dos mecanismos depende principalmente da condição de estresse, mas os componentes da matriz também podem interferir na resposta celular.

2.1.1.1 pH

As células probióticas durante a fermentação produzem ácidos, principalmente ácido lático, trazendo uma resistência intrínseca aos ambientes ácidos. O ácido é liberado para aumentar os prótons fora da célula que podem se difundir passivamente nas células que desregulam o gradiente de pH transmembrana e a força motriz do próton (GUAN; LIU, 2020; HILL *et al.*, 2018). Entre as contrarreações para evitar danos estão a via deiminase arginina, aminoácidos, bomba de prótons F-ATPase (F₀F₁), modulação da membrana celular e reparo de DNA e proteína danificados.

Para equilibrar o pH da célula, os aminoácidos podem ser desaminados para que as frações NH₃ reajam com prótons fora da célula para alcalinizar o meio. Esse processo também acontece na via arginina deiminase, onde a arginina através de diferentes enzimas produz NH₃ além de energia (NOVÁK *et al.*, 2016). A bomba de prótons F-ATPase é empregada por microrganismos Gram-positivos para combater os danos causados pelo estresse. A F₀F₁-ATPase consiste em uma porção catalítica (F₁) com cinco subunidades para hidrólise de ATP e uma porção de membrana integral (F₀) com três subunidades, que funcionam como um canal membranoso para translocação de prótons (CORCORAN *et al.*, 2005). Esta enzima multimérica reversível produz ATP mantendo um fluxo de prótons para dentro da célula. No entanto, sob estresse ácido, a molécula de ATP é hidrolisada revertendo o fluxo de prótons do citoplasma para fora da

célula, preservando também a homeostase do pH intracelular (PAPADIMITRIOU *et al.*, 2016). Os microrganismos com a atividade ótima do F-ATPase sob baixo pH tem sua sobrevivência aumentada contra o estresse ácido, pois esse mecanismo protege enzimas importantes, por exemplo, *L. casei* 685 mostrou atividade F-ATPase ótima em pH 5 a 5,5 (NANNEN; HUTKINS, 1991). O estudo com seis cepas diferentes *L. acidophilus* DPC201, *L. plantarum* DPC206, *Pediococcus acidilactici* DPC209, *L. reuteri* DPC16, *L. rhamnosus* HN001 e *Bifidobacterium lactis* HN019 mostrou que a presença de açúcar sob pH baixo simultaneamente com a bomba de próton F1F0-ATPase ajudou na manutenção de condições favoráveis para a funcionalidade de enzimas intracelulares, como a esterase com ótimo pH 6 a 7 e inibição acima do pH 4 (CHEN *et al.*, 2012).

A membrana celular é o primeiro alvo sob condições de estresse, da mesma forma, várias modulações ocorrem para fornecer um ambiente intracelular constante para o metabolismo e crescimento celular. Para se encaixar em um ambiente ácido mantendo sua integridade e fluidez as células bacterianas podem alterar o tamanho do canal para a passagem de prótons. Além disso, também podem melhorar as composições lipídicas da membrana plasmática, alongando suas cadeias de ácidos graxos, aumentando sua proporção ou tipo de ramificação (GUAN; LIU, 2020; KAISER *et al.*, 2016). A produção de exopolissacarídeos na parede celular também pode ser aprimorada por ser uma barreira extra contra estressores, como a acidez (CASTRO-BRAVO *et al.*, 2018). A cepa de *L. casei* 4646 alterou a composição da membrana em resposta ao pH ácido aumentando os níveis de ácidos graxos monoinsaturados da membrana (FOZO; KAJFASZ; QUIVEY, 2004). Em um estudo com diferentes cepas probióticas, as paredes celulares das bactérias apresentaram alterações na morfologia causadas pelo estresse ácido na fase gástrica, a rugosidade e o afinamento podem indicar a resposta adaptativa como a biossíntese de peptideoglicano e ácidos graxos (RODRIGUES *et al.*, 2019). Para reparar o DNA e proteínas, pode haver uma alta produção de proteínas que evitam a dobra incorreta das proteínas e reparação das proteínas danificadas (HILL *et al.*, 2018; PAPADIMITRIOU *et al.*, 2016).

2.1.1.2 Pressão osmótica

O estresse osmótico leva a diferentes respostas devido à baixa atividade hídrica que pode afetar diretamente funções celulares importantes, além de inibir o metabolismo na fase posterior da fermentação (TIAN *et al.*, 2018). A parede celular sofre alterações conformacionais que podem romper a formação de biofilmes, e vincular cátions, porém, aumentando a suscetibilidade a peptídeos antimicrobianos que comprometem funções da parede celular (HILL *et al.*, 2018). Em outros casos, os ambientes hiper osmóticos fazem com que as cepas probióticas iniciem um processo de acúmulo intracelular de osmoprotetores que restauram a pressão de turgor da célula e preserva funções das proteínas celulares. Os osmoprotetores são pequenas moléculas orgânicas altamente solúveis em água com um ponto isoelétrico neutro. As mais comuns são betaína glicina, colina, carnitina, trealose e dimetilsulfonioacetato que são extraídos do meio externo (matriz alimentar) (GAUCHER *et al.*, 2019; LE MARREC, 2011). Esses solutos compatíveis estabilizam o potencial osmótico e não comprometem processos celulares mesmo em concentrações muito altas. Outro mecanismo é o acúmulo de aminoácidos na célula. Diferentes aminoácidos (prolina, alanina, aspartato etc.) aumentam sua concentração no ambiente intracelular, porém, o glutamato (K^+ e seu counter-ion glutamato) é o mais comum na adaptação osmótica celular (GAUCHER *et al.*, 2019; PAPADIMITRIOU *et al.*, 2016).

Estudos anteriores relataram diferentes respostas dependendo da cepa probiótica, do meio externo, da exposição à pressão osmótica, além das lesões anteriores das células. Em suco de mandarina enriquecido com *Lactobacillus salivarius* spp. *salivarius* CECT4063 apresentou menor crescimento de microrganismos em maior pressão osmótica devido à adição de trealose. Em resposta ao estresse hiper osmótico, a parede celular aumentou sua hidrofobicidade que está diretamente relacionada à capacidade de adesão e interação com a parede intestinal (BETORET *et al.*, 2017). Comparando o suco de abacaxi adoçado e não adoçado durante o armazenamento, o estresse osmótico diminuiu a viabilidade do *L. casei* B-442 porque o estresse hiper osmótico diminuiu a taxa de crescimento celular e a atividade celular (COSTA *et al.*, 2013a). *L. paracasei* NCBI001-M2, após melhoramento genético, aumentou seu limiar osmótico modulando a membrana celular com ácidos graxo insaturados, além de aumentar osmoprotetores intracelular (TIAN *et al.*, 2018). Em meio contendo betaína

glicina, esse osmoprotetor desempenhou um papel protetor ao aumentar sua concentração intracelular diminuindo o efeito nocivo do estresse osmótico em *L. bulgaricus* 34.5 garantindo sua viabilidade (HAN *et al.*, 2018). Na fermentação de *L. casei* G-02 a 45 °C, o estresse osmótico causado pela glicose inibiu o crescimento e a produção de ácido lático (GE *et al.*, 2011).

2.1.1.3 Sais biliares

Sais ou ácidos biliares são produzidos a partir do colesterol, conjugado no fígado com taurina ou glicina, e secretados no intestino delgado (XIONG *et al.*, 2017). Essas moléculas bioativas são substratos para receptores de ácido biliar, presentes em todo o corpo controlando processos regulatórios e metabólicos (FOLEY *et al.*, 2019). No entanto, no sistema gastrointestinal a bile auxilia no processo de digestão dos lipídios sendo um ponto crítico na sobrevivência dos microrganismos probióticos. Os sais biliares são os principais componentes da bile, detergentes biológicos que facilitam a emulsificação e solubilização de lipídios e além da potente atividade antimicrobiana (BUSTOS *et al.*, 2018). A bile atravessa a parede celular e distorce a estrutura lipídica bicamada das membranas, os poros são formados para permitir a liberação de conteúdo intracelular (LI *et al.*, 2015). A bile também pode promover a acidificação do citoplasma, e causar danos ao DNA/proteína que geram lesões celulares que podem ser posteriormente reparadas ou não (HILL *et al.*, 2018; LI *et al.*, 2020a).

Algumas cepas da família *Lactobacillaceae*, amplamente aplicadas como probióticos, podem produzir hidrolases de sais biliares que melhoram a tolerância à bile. *Lacticaseibacillus* suportam várias condições adversas dos processos industriais e durante o trânsito gastrointestinal, e os sais biliares são um ponto importante em sua sobrevivência. *Lacticaseibacillus* não tem o gene para a produção hidrolase de sais biliares sendo sensível a bile (XIONG *et al.*, 2017). No entanto, as características dos estudos devem ser consideradas, uma vez que a baixa concentração de bile, as condições de crescimento, o tipo de ácidos biliares utilizados e condições diferentes de ensaio podem inferir na resposta do estudo. Assim, a tolerância do probiótico aos sais biliares não depende apenas da presença de hidrolase de sal biliar, mas de uma série de mecanismos como a presença de bombas de efluxo, a capacidade intrínseca das células

para manter a homeostase intracelular e a modulação na estrutura e composição da membrana celular. Neste último cenário, as bactérias Gram-positivas são mais suscetíveis devido à presença de lipopolissacarídeos presente no folheto externo da membrana externa, proteínas Toll e bombas de efluxo (BUSTOS *et al.*, 2018).

Os simbióticos são uma estratégia importante para aumentar a sobrevivência celular durante a digestão gastrointestinal devido ao efeito protetor dos prebióticos. No entanto, alguns prebióticos causam um efeito negativo no cólon, reduzindo a desconjugação dos sais biliares ou diminuindo a atividade de hidrolase de sais biliares. *L. acidophilus* NCTC 1723 foi incubado com inulina e mostrou que altos níveis (> 6 %) podem reduzir a atividade de hidrolase de sais biliares, além da condição ácida pode favorecer sua atividade, uma vez que seu pH ideal é 4 (ADEBOLA; CORCORAN; MORGAN, 2020). Além disso, a modulação da parede celular também foi relatada como resposta do estresse causado pela bile como a cepa de *Lactococcus lactis* NZ9000 que aumentou a parede celular 1,9 vezes pela adição de transglutaminase exógenas conferindo resistência ao estresse (LI *et al.*, 2015).

2.1.1.4 Reações oxidativas

O estresse oxidativo é gerado pela produção e acúmulo de espécies reativas de oxigênio (ROS) no ambiente intracelular. As moléculas de ROS são geradas sob condições oxidativas que compreendem uma variedade de composições, incluindo oxigênio singlete $^1\text{O}_2$, radical hidroxila $\text{OH}\cdot$, superóxido radical $\text{O}_2\cdot$, peróxido de hidrogênio H_2O_2 , e ozônio O_3 . Entre eles, os mais prejudiciais são $^1\text{O}_2$ com um tempo de vida > 75 min e $\text{OH}\cdot$ que tem alta penetrabilidade e poder de difusão através de paredes celulares (ZHU *et al.*, 2020).

ROS induz danos oxidativos em biomoléculas, como carboidratos, proteínas, lipídios, nucleotídeos e DNA (TSAI *et al.*, 2009). Esse processo leva à lipoperoxidação, inativação enzimática e quebra do DNA. O ROS pode atacar a membrana fosfolipídica das células, que tem como principal componente ácidos graxos poli-insaturado, levando a morte celular. Há diferenças entre os mecanismos de ação dos ROS contra Gram-positivo e Gram-negativo. Por exemplo, *Escherichia coli*, microrganismo Gram-negativo, foi inativada principalmente por vazamento do conteúdo intracelular e pouco

dano ao DNA. Enquanto, *Staphylococcus aureus*, Gram-positivo, foi inativado por danos intracelulares, maior acúmulo intracelular de ROS e pouco dano de membrana (HAN *et al.*, 2016). *Lactocaseibacillus* utilizam mecanismos enzimáticos de defesa contra ROS. Entre as enzimas estão a tioredoxina e tioredoxina redutase, catalase, NADH oxidases, NADH peroxidases e sistemas superóxido dismutase (SOTO *et al.*, 2019). No caso da catalase, mostrou-se que sua capacidade de usar H_2O_2 como substrato é importante para evitar o estresse oxidativo (PAPADIMITRIOU *et al.*, 2016). As cepas de BAL são catalase-negativa, embora, algumas cepas de *Lactocaseibacillus* possam degradar H_2O_2 através da ação de uma catalase não-heme, dependente de manganês. Essa enzima aumentou a resistência ao estresse oxidativo e melhorou a sobrevivência no processo aerado (REALE *et al.*, 2016; ROCHAT *et al.*, 2006).

2.1.1.5 Armazenamento

Durante o armazenamento de probióticos, as células têm que suportar diferentes causadores de estresse, como pH ácido devido à produção de ácido lático, flutuação osmótica pela liberação de açúcares e choque frio, já que antes da digestão humana a maioria dos alimentos probióticos precisam de refrigeração. As baixas temperaturas alteram propriedades físico-químicas intracelulares, porque levam à modulação da taxa de difusão da membrana e fluidez. Durante o armazenamento a frio são produzidas proteínas de choque frio que estão relacionadas ao metabolismo sob baixas temperaturas, mantendo o fluxo de ácidos graxos de cadeia curta e/ou insaturados e protegem a estrutura do DNA (HILL *et al.*, 2018).

Os probióticos processados sob leve estresse podem ter melhor estabilidade durante o armazenamento, no entanto, esse efeito está relacionado à interação entre a cepa e a matriz alimentar. Por exemplo, três cepas filogeneticamente e fenotipicamente relacionadas têm respostas diferentes após o choque frio, as cepas de *L. casei* foram menos afetadas pelo estresse frio em comparação com *L. paracasei* e *L. rhamnosus* (REALE *et al.*, 2015). Os estudos a seguir mostram as diferentes respostas que *L. casei* B-442 apresentou sob armazenamento a frio em diferentes sucos de frutas como matriz. Suco de caju adoçado com sacarose apresentou um melhor efeito protetor para *L. casei* B-442 com 8,65 log UFC/mL durante 42 dias de armazenamento a frio (PEREIRA *et al.*,

2013b). Enquanto isso, no suco de cacau (*Theobroma cacao L.*) adoçado com sacarose a viabilidade celular após 42 dias diminuiu 1 log UFC/mL mantendo 7,6 log UFC/mL. No entanto, o uso de sacarose apresentou maior efeito protetor do que a sucralose no suco de cacau probiótico (SANTOS FILHO *et al.*, 2019). No suco de melão a sobrevivência celular do *L. casei* B-442 (8,3 log UFC/mL) foi mantida durante 42 dias, enquanto no suco de abacaxi as células diminuíram 2 ciclos log após 21 dias de armazenamento mantendo 6,2 log UFC/mL após 42 dias (COSTA *et al.*, 2013b; FONTELES *et al.*, 2012).

2.2 *Lacticaseibacillus casei*

L. casei pode ser usado para produzir diferentes produtos probióticos desde a cultura inicial para a fermentação do leite até uma cultura adjunta para intensificar e acelerar o desenvolvimento de sabor no queijo (XIONG *et al.*, 2014). Essas bactérias promovem o balanço da microbiota intestinal, aumentando as bactérias benéficas e diminuindo as prejudiciais. Dentre outros benefícios relacionados a essas cepas estão diminuir o colesterol sérico, atividade antitumoral, imunestimulatória imunomodulação, combate a infecção e alívio da má indigestão de lactose (SONG *et al.*, 2019; ZHANG *et al.*, 2020).

As cepas de *L. casei* foram isoladas de uma variedade de ambientes, como laticínios e fermentados lácteos, materiais vegetais e tratos gastrointestinais de animais e humanos (WANG *et al.*, 2012). Essas bactérias eram classificadas como heterofermentativa facultativa produzindo ácido láctico a partir de açúcares de hexose através da via Embden-Meyerhof e da pentose pela via 6-fosfogluconato/fosfocetolase (HILL *et al.*, 2018; MARKOWIAK-KOPEĆ; ŚLIŻEWSKA, 2020). No entanto, com a reclassificação em 2020 as cepas do gênero *Lacticaseibacillus* foram consideradas homofermentativas com exceção de algumas, que não metabolizam pentoses através da via da fosfocetolase (ZHENG *et al.*, 2020). Caracteriza-se como Gram-positivo, não esporulada, e em forma de bastão (PAPADIMITRIOU *et al.*, 2016). As cepas de *L. casei* usam oxigênio sob crescimento aeróbico através de enzimas como tiorredoxina e tiorredoxina redutase, catalase, NADH oxidases, NADH peroxidases e sistemas superóxido de dismutase. Além disso, existem também mecanismos não enzimáticos de defesa contra espécies reativas de oxigênio (ROS) como Mn^{2+} , ascorbato, tocoferol e

glutathiona (SOTO *et al.*, 2019). A ausência dessas moléculas pode causar morte celular devido ao ataque de ROS a proteínas, lipídios e ácidos nucleicos.

O crescimento do *L. casei* pode ser afetado pelo pH, temperatura, além da matriz alimentar que também interfere no crescimento do probiótico, sobrevivência e funcionalidade. Na literatura, as condições ideais de pH e temperatura para o crescimento de *L. casei* são 5,5-6,2 e 30-40 °C. No entanto, para o uso dessas cepas em suco de frutas, por exemplo, a interação com matriz deve ser analisadas pois características como taxa de crescimento da bactéria, metabolismo e atividade proteolítica pode variar de acordo com a cepa e matriz (COSTA *et al.*, 2013b; OLIVARES *et al.*, 2019; ŚLIŻEWSKA; CHLEBICZ-WÓJCIK, 2020). As condições ideais para crescimento e viabilidade de *L. casei* B-442 no suco de melão foram em pH 6,1 a 31 °C durante 8 h (FONTELES *et al.*, 2012). Em suco de cacau (*Theobroma cacao* L.) as condições ideais para crescimento e viabilidade de *L. casei* B-442 foram em pH 6,2 a 33 °C durante 12 h (SANTOS FILHO *et al.*, 2019)

As cepas de *L. casei* são amplamente aplicadas na indústria alimentícia devido os benefícios para a saúde, propriedades nutricionais favoráveis e resistência a condições adversas. Algumas cepas como *L. casei* Shirota, têm alta tolerância ao pH gástrico e sais biliares (WANG *et al.*, 2012). *L. casei* BL23 demonstrou resistência as condições adversas do processo digestivo de camundongos, apresentando contagens de células viáveis de 5 log UFC/g nas fezes dos camundongos após 24 h de cada administração (YIN *et al.*, 2014).

Em todo o mundo, o número de pessoas com alergia alimentar ultrapassa 520 milhões. Esse número dificulta o esforço científico para criar uma dieta pouco antigênica que neutralize a alergia alimentar (RUIZ SEGURA *et al.*, 2020). Em um estudo, o leite fermentado com *L. casei* LcY mostrou uma redução da imunorreatividade após a fermentação, diminuindo mais ao longo das fases de digestão *in vitro*. Entre as proteínas do leite, α -caseína foi a mais alergênica (WRÓBLEWSKA *et al.*, 2016). Este resultado indica a importância das cepas probióticas para auxiliar na prevenção e no tratamento de alergias.

As cepas de *L. casei* são aplicadas como *starters* ou aditivos na produção de alimentos fermentados, incluindo leite fermentado, iogurte, carnes e salsichas

(WRÓBLEWSKA *et al.*, 2016). Os microrganismos do gênero *L. casei* precisam ter boa atividade proteolítica para o seu crescimento em matrizes lácteas. Com isso produzem peptídeos de baixa massa molecular a partir da proteína do leite para suprir a necessidade de aminoácidos (ABDEL-HAMID *et al.*, 2019). A maioria dos probióticos tem uma baixa taxa de crescimento e acidificação no leite, exigindo um longo tempo de fermentação com apenas uma cepa probiótica. Portanto, o uso das cepas de *L. casei* em produtos lácteos enfrentam um ambiente desfavorável devido a baixas quantidades de certos nutrientes cruciais (LI *et al.*, 2020b).

L. casei requer diferentes nutrientes para seu crescimento ótimo como íons metálicos, aminoácidos, vitaminas, minerais e nucleotídeos. Algumas cepas de *L. casei* não são capazes de usar lactose como fonte de carbono. Além disso, na ausência de glicose no leite outras fontes de energia podem ser usadas, incluindo citrato, traços de carboidratos derivados de glicoproteínas do leite e glicolipídios (WANG *et al.*, 2012). A suplementação com ácido ascórbico no leite reduziu o tempo de fermentação para *L. casei* DSM 20011 e aumentou a contagem de viáveis (SOTO *et al.*, 2019). O tamanho do inóculo também pode alterar o crescimento de *L. casei*, como observado por GENEVOIS *et al.* (2016) no qual maiores quantidades de inóculo diminuiu o crescimento celular.

Em estudos recentes, as cepas de *L. casei* foram imobilizadas através de encapsulamento ou interações iônicas em alginato, e moléculas como carboidratos, lipídios e proteínas. As técnicas de imobilização garantem a viabilidade durante a vida útil e aumentam a taxa de sobrevivência através do ambiente gastrointestinal (DE SOUZA *et al.*, 2019). *L. casei* (cepa não informada) foi microencapsulada em dois hidrocolóides diferentes, alginato de cálcio e proteína de soro de leite concentrada. Essas microcápsulas probióticas apresentaram maior sobrevivência em condições gástricas em comparação com células livres com redução de 0,95 e 1,13 log UFC/mL para alginato de cálcio e proteína de soro de leite concentrada, respectivamente (AFZAAL *et al.*, 2020). Uma desvantagem dos processos de encapsulação são as duas operações diferentes: produção de células probióticas em maior quantidade e, em seguida, a mistura com uma solução biopolimérica. Para evitar os custos de dois processos separados, a fermentação em estado sólido foi proposta por CASTELLANOS FUENTES *et al.* (2020). O estudo utilizou subprodutos vegetais (okara do leite de soja) para fornecer substratos, e seus componentes atuaram como suporte para proteção de células probióticas, sendo armazenados sem

refrigeração por 63 dias com 6 log UFC/g. A celulose bacteriana foi um suporte eficaz protegendo *L. casei* ATCC 393 do pH ácido, enzimas digestivas e sais biliares. Os autores observaram que uma co-cultura com *Gluconacetobacter xylinus* poderia promover a imobilização *L. casei* ATCC 393 e fornecer um alto nível de proteção dos microrganismos contra os fatores adversos da digestão (FIJAŁKOWSKI *et al.*, 2016). Além das maiores taxas de sobrevivência na exposição a condições gastrointestinais, a imobilização celular pode trazer vantagens sensoriais e microbiológicas devido à produção de compostos voláteis, e moléculas antimicrobianas por células probióticas viáveis. Em queijo *Feta* foi melhorado o sabor e estabilidade microbiológica aumentando o armazenamento para 120 dias, após a adição de *L. casei* ATCC 393 imobilizado em farelo de trigo (TERPOU *et al.*, 2018).

Sucos de frutas são matrizes adequadas para a ingestão de probióticos, mas o estudo de sua interação com microcápsulas de alginatos mostrou que o pH ácido do suco de frutas pode afetar a viabilidade do microrganismo. O suco de abacaxi (pH 3,28) causou ruptura das microcápsulas, mas manteve a viabilidade do *L. casei* DSM 20011, enquanto o suco de framboesa (pH 2,75) a viabilidade do probiótico diminuiu rapidamente, causada pela difusão das antocianina para o interior das microcápsulas diminuindo ainda mais o pH (OLIVARES *et al.*, 2019). A variação do pH afetou diretamente a sobrevivência dos probióticos, porém, o teor de açúcar da composição do suco de fruta, vitaminas, enzimas, compostos fenólicos, e outros compostos podem diminuir os danos as células probióticas. Além disso, a imobilização é uma técnica biotecnológica que melhora a sobrevivência de probiótico, e quando um ingrediente prebiótico é usado como suporte é produzido um simbiótico. MANTZOURANI *et al.* (2020) usaram farelo de trigo delignificado, um carboidrato fermentável pela microbiota intestinal, para imobilizar *L. paracasei* K5. O biocatalizador produziu suco de romã simbiótico, no qual foi observado a proteção e aumento da viabilidade das células probióticas. *L. casei* B-442 foi aplicado na fermentação de diferentes sucos de frutas cacau (*Theobroma cacao L.*), caju, cupuaçu (*Theobroma grandiflorum*), abacaxi e melão apresentando alta viabilidade e estabilidade durante o armazenamento com contagens de 6 a 8 log UFC/mL (COSTA *et al.*, 2013b; FONTELES *et al.*, 2012; PEREIRA *et al.*, 2013a; SANTOS FILHO *et al.*, 2019).

2.3 Frutooligossacarídeos

O prebiótico é "substrato que é seletivamente usado por microrganismos do hospedeiro conferindo benefícios à saúde do hospedeiro" (GIBSON *et al.*, 2017; SALMINEN *et al.*, 2021). Em 2004, para ser considerado prebiótico o substrato necessitava: resistir ao processo de digestão (pH ácido ~2 do estômago, hidrólise por enzimas mamíferas, e não ser absorvido no trato gastrointestinal); ser fermentável pela microbiota intestinal e estimular seletivamente o crescimento e/ou atividade das bactérias intestinais trazendo benefícios para a saúde (GIBSON *et al.*, 2010). No entanto, esse conceito precisou ser ampliado já que a interação apenas com a microbiota intestinal excluía microbiotas extra intestinais como a da pele e urogenital (GIBSON *et al.*, 2017).

Os prebióticos, geralmente são carboidratos, mas outras substâncias, como polifenóis e ácidos graxos poli-insaturados convertidos nos respectivos ácidos graxos conjugados podem ter efeito prebiótico (ALVES-SANTOS *et al.*, 2020; GIBSON *et al.*, 2017). São encontrados em uma variedade de alimentos como feijão, lentilha, grão de bico, tomate, cebola, alho, chicória, banana, frutas vermelhas, além do leite humano (MOHANTY *et al.*, 2018). No entanto, também podem ser produzidos por via enzimática como os glicooligossacarídeos, xilooligossacarídeos, lactulose, maltooligossacarídeos frutooligossacarídeos, galactooligosacarídeos e inulina (DA SILVA *et al.*, 2019; DE LA ROSA *et al.*, 2019; ZHAO *et al.*, 2017).

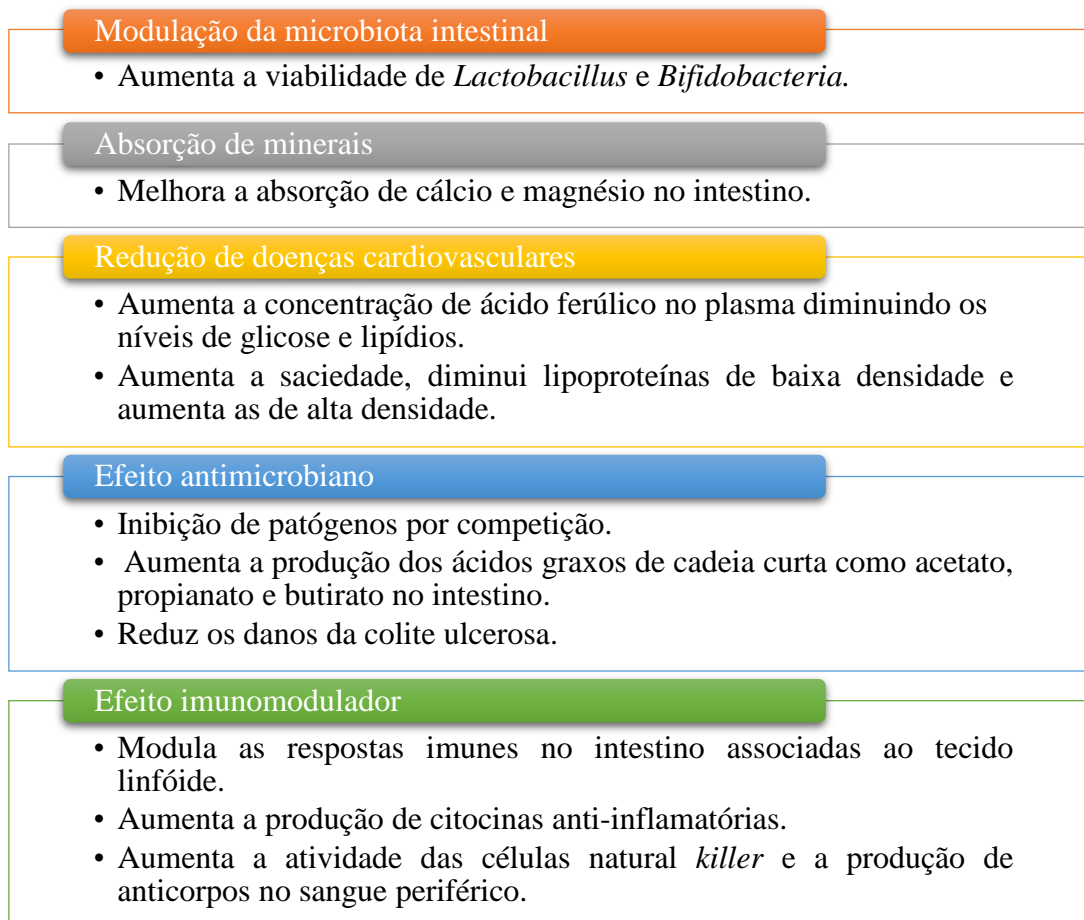
O mercado mundial de prebióticos deve crescer cerca de 12,7% até 2025, com um lucro de aproximadamente US\$ 10,55 bilhões (HURTADO-ROMERO *et al.*, 2020). E com a descoberta de novos substratos com efeito prebiótico esse mercado deve se expandir mais. Por exemplo, pectina e mucilagem devido suas características como complexo estrutura de grau de polimerização, peso molecular e presença de ramificação são lentamente metabolizadas pela microbiota intestinal podendo ser aplicada como prebiótico (HURTADO-ROMERO *et al.*, 2020). Os polifenóis também promovem a modulação da microbiota intestinal devido à baixa biodisponibilidade favorecendo a interação com microrganismos no intestino. O consumo de polifenóis foi relacionado ao aumento de microrganismos benéficos como *Lactobacillus acidophilus*, *Bifidobacterium* spp e *Faecalibacterium* spp (ALVES-SANTOS *et al.*, 2020).

As fibras prebióticas são as mais usadas, dentre elas a inulina e sua fração parcial hidrolisada, frutooligossacarídeo (FOS), se destacam pelo os efeitos benéficos ao microbioma intestinal (LIU *et al.*, 2017). Os FOS são compostos de glicose e duas ou mais unidades d-frutose ligadas por uma ligação glicosídica de β -(2,1) ou β (2-6), com uma unidade terminal de glicose ou frutose sendo denominadas de acordo com o grau de polimerização (GP) em 1-kestose (GP2), nistose (GP3) e 1F- β -fructofuranosilnistose (GP4) (KAPRASOB *et al.*, 2018). Os FOS são fibras solúveis com até 10 graus de polimerização e poder adoçante 6 vezes maior que a sacarose (DAVANI-DAVARI *et al.*, 2019; REZENDE; LIMA; NAVES, 2021).

Os FOS podem ser produzidos através de enzimas como β -frutofuranosidase (FFases, EC.3.2.1.26) e frutossiltransferase (FTases EC.2.4.1.9). O mecanismo para ativar essas enzimas depende da quantidade de sacarose no meio. Quando em alta concentração de sacarose, essas enzimas catalisam reações hidrolíticas e de transfrutosilação. Por outro lado, com baixa concentração de sacarose, elas possuem apenas atividade transfrutossil, transferindo frutose ligada no β -(2-1) da sacarose a um aceptor como outras moléculas de sacarose, sintetizando FOS e liberando glicose (MUÑIZ-MÁRQUEZ *et al.*, 2016).

Os FOS promovem benefícios à saúde através da sua fermentação no cólon por microrganismos benéficos levando a mudanças no microbioma intestinal com o aumento de *Bifidobacterium* spp., *Akkermansia muciniphila* e *Faecalibacterium prausnitzii* e de metabólitos como AGCC e outras moléculas bioativas (NÚÑEZ-SÁNCHEZ *et al.*, 2021). Na Figura 1 são mostrados alguns mecanismos dos FOS para promover a saúde.

Figura 1- Mecanismo dos frutooligosacarídeos para promover benefícios à saúde



Fonte: Adaptado de MOHANTY *et al.*, (2018).

Em geral, a ingestão de prebióticos sugerida é de 3 g por dia para promover um benefício à saúde (ALMEIDA *et al.*, 2017). Contudo, a ingestão diária recomendada de FOS é entre 2 g e 12 g (REZENDE; LIMA; NAVES, 2021). A legislação brasileira (ANVISA) recomendava a ingestão diária (RDI) de alimentos contendo compostos prebióticos, incluindo FOS de pelo menos 3 g em alimentos sólidos ou 1,5 g em alimentos líquidos. No entanto, uma nova regulamentação estabeleceu 5 g de FOS no produto pronto para comer, e o consumo não deve ultrapassar 30 g/dia em alimentos prontos para comer (ALMEIDA *et al.*, 2017; ANVISA, 2019).

Os efeitos promovidos pelo o uso de FOS já foram discutidos em diferentes estudos. Em um estudo *in vivo* com ratos a inserção de *L. casei* ASCC 292/FOS/maltodextrina a dieta promoveu uma maior concentração de ácido láctico que

pode ter contribuído para a diminuição dos microrganismos patogênicos (LIONG; SHAH, 2006). A combinação *L. casei* L1 e FOS foi capaz de manter viabilidade do probiótico em condições digestivas como também apresentou ampla atividade antimicrobiana contra bactérias patogênicas (TULUMOĞLU; ERDEM; SIMŞEK, 2018). Experimentos de crescimento indicaram a capacidade de *L. acidophilus* ATCC 4356 e *B. lactis* BI-07 de fermentar FOS, além de comprovar a integridade de prebiótico durante o processo de digestão (DE FIGUEIREDO; DE BARROS RANKE; DE OLIVA-NETO, 2020). Além disso, a adição de FOS em suco de frutas é uma alternativa viável para produção de sucos prebióticos, como mostrado para suco de *cranberry* e suco de laranja (ALMEIDA *et al.*, 2017; GOMES *et al.*, 2017; SÁEZ-ORVIZ *et al.*, 2020).

2.4 Simbióticos

Em 2019, a Associação Científica Internacional de Probióticos e Prebióticos (ISAPP) convocou um painel de especialistas e atualizou a definição de simbióticos para "uma mistura composta por microrganismos vivos e substrato (s) seletivamente utilizados por microrganismos hospedeiros que confere um benefício à saúde do hospedeiro" (SWANSON *et al.*, 2020). No entanto, a partir da interação entre o probiótico, o substrato e a microbiota autóctone eles podem ser classificados em simbióticos sinérgicos e complementares. Assim, um simbiótico sinérgico é aquele que o prebiótico favorece o crescimento da cepa probiótica que será coadministrada. Enquanto, o simbiótico complementar é aquele que o prebiótico promoverá seletivamente o crescimento das bactérias autóctone, e não da cepa probiótica coadministrada (NÚÑEZ-SÁNCHEZ *et al.*, 2021; SWANSON *et al.*, 2020).

Dentre as vantagens dos produtos simbióticos estão o aumento da viabilidade dos probióticos durante o armazenamento, maior sobrevivência durante o processo de digestão, como mostrado nos estudos a seguir. O sorvete simbiótico com *Saccharomyces boulardii* CNCM I-745 e inulina demonstrou que o prebiótico aumentou a viabilidade probiótica ao longo do armazenamento, além de melhorar propriedades de fusão e estabilidade do sorvete (SARWAR *et al.*, 2021). Uma melhor viabilidade durante o armazenamento também foi demonstrado em iogurte simbiótico enriquecido com *L. brevis* KU200019 e FOS (KARIYAWASAM; LEE; PAIK, 2021). O prebiótico ácido

lactobiônico foi usado para preparar um revestimento simbiótico com *L. plantarum* CECT 9567 para o queijo *cottage*, aumentando a sobrevivência da cepa probiótica durante a digestão simulada *in vitro* (SÁEZ-ORVIZ *et al.*, 2020). O prebiótico lactitol e a cepa *L. casei* 30-1 foram microencapsulados em alginato e incorporados em iogurte. A presença do prebiótico nas microcápsulas favoreceu a sobrevivência do probiótico durante o armazenamento, mas diminuiu a qualidade do iogurte (LI *et al.*, 2020b). A viabilidade e a resistência às condições gastrointestinais de *L. acidophilus* La-5 e *B. animalis* Bb-12 no sorvete de maçã simbiótico não foi afetado com a adição de inulina. No entanto, a modulação da matriz com adição de leite ou extrato de soja aumentou a taxa de sobrevivência dos probióticos no final do armazenamento (MATIAS *et al.*, 2016). Por outro lado, a inulina aumentou a sobrevivência do *B. animalis* Bb-12 na margarina simbiótica durante o armazenamento e digestão simulada *in vitro*, o aumento da sobrevivência foi visto com o aumento da concentração de inulina (SOUZA; GIOIELLI; SAAD, 2017).

Os cereais têm sido usados no desenvolvimento de bebidas simbióticas devido ao alto teor de fibras dietéticas prebióticas, incluindo β -glucana, arabinosilanas, FOS e isomaltooligosacarídeos. Além do amido, que também pode ser usado como substrato por microrganismos na presença de umidade e enzimas hidrolíticas (FREIRE; RAMOS; SCHWAN, 2017; KUMAR; KAUR; TOMER, 2020). Investigando o potencial sinérgico dos cereais e *Lactobacillus* spp. mostrou-se que os simbióticos com cereais apresentam maior taxa de crescimento probiótico em comparação com o leite sob as mesmas condições (KUMAR; KAUR; TOMER, 2020). A fermentação da bebida mista de milho e arroz por uma mistura de culturas com *L. plantarum* CCMA 0743, *Torulaspora delbrueckii* CCMA 0235, e *L. acidophilus* LACA 4 foi avaliada a partir da adição de diferentes concentrações de FOS (20 e 50 g/L). A adição de 50 g/L de FOS melhorou o crescimento probiótico permanecendo acima de 7 log UFC/mL durante o armazenamento (FREIRE; RAMOS; SCHWAN, 2017).

Os sucos de frutas são uma boa escolha para todas as idades, devido ao seu sabor atraente, conteúdo de vitaminas, compostos antioxidantes e minerais. Além disso, os nutrientes do suco de frutas também podem favorecer o crescimento das BAL, tornando-os promissoras matrizes simbióticas como comprovados nos trabalhos a seguir. Em suco de goiaba simbiótico a adição de inulina não aumentou a sobrevivência do *L.*

rhamnosus ATCC 7469 durante digestão *in vitro*, mas aumentou a viabilidade das células durante o armazenamento em 19% (ANDRADE *et al.*, 2019). O mesmo foi comprovado em néctares misto de cenoura e laranja, no qual *L. acidophilus* CECT 903, no qual o aumento da concentração de inulina aumentou a sobrevivência do probiótico durante o armazenamento (VALERO-CASES; FRUTOS, 2017). O suco de cereja cornalina (*Cornus mas* L.) utilizando *L. paracasei* K5 melhorou a sobrevivência do probiótico quando imobilizado no farelo de trigo prebiótico (MANTZOURANI *et al.*, 2019). Resultado similar foi obtido para suco de romã com a mesma cepa imobilizada em farelo de trigo. Curiosamente, a maior viabilidade foi para o suco com o pH (3,9) menos ácido, mostrando que *L. paracasei* K5 é sensível ao estresse ácido (MANTZOURANI *et al.*, 2020).

O papel dos simbióticos e seus benefícios para a saúde deve-se a desequilíbrios na microbiota intestinal (disbiose) geralmente causado por alterações alimentares, uso de antibióticos, idade ou infecções. A disbiose pode aumentar o risco de doenças intestinais (doença inflamatória intestinal, câncer de cólon), neurológicas (doenças de Parkinson) e doenças cardiometabólicas. Os simbióticos podem equilibrar a microbiota intestinal que tem aproximadamente 100 trilhões de microrganismos como bactérias, leveduras e vírus. No intestino, os microrganismos convertem seus substratos em moléculas bioativas que participarão de processos fisiológicos melhorando o sistema imunológico, a homeostase intestinal e o metabolismo do hospedeiro (NÚÑEZ-SÁNCHEZ *et al.*, 2021). A ingestão de simbióticos pode ser direcionada para melhorar os sintomas, assim como diminuir o risco de doenças. Diabetes *mellitus* tipo 2 está associado com hiperglicemia, resistência à insulina e disbiose intestinal. Assim, os produtos simbióticos têm melhores propriedades antidiabéticas do que os alimentos lácteos fermentados. A possível explicação é a redução do estresse oxidativo e a inibição de marcadores pró-inflamatórios (ZEPEDA-HERNÁNDEZ *et al.*, 2021). A doença hepática gordurosa não alcoólica é causada pelo acúmulo de gordura no fígado de indivíduos alcoolistas abstêmios. Assim, a ingestão de simbióticos pode diminuir suas principais causas de inflamação, resistência à insulina, estresse oxidativo, obesidade e dislipidemia (SANGOUNI; GHAVAMZADEH, 2019). *Helicobacter pylori* causa uma infecção chamada gastrite. Os sintomas causados pela *H. pylori* pode ser tratados a partir da suplementação com produtos simbióticos, que também diminui eventos adversos causados pelo tratamento com antibiótico (POURMASOUMI *et al.*, 2019). O consumo

de alimentos simbióticos reduziu os sintomas do autismo em crianças e melhorou a regulação das emoções em adultos com transtorno do déficit de atenção com hiperatividade. A melhoria da microbiota intestinal atenua as vias do eixo intestino-cérebro, afetando a inflamação sistêmica de baixo grau, a permeabilidade da barreira hematoencefálica, maturação e ativação de células micróglias, sinaptogênese e controle motor que estão relacionadas a essas doenças neurológicas (SKOTT *et al.*, 2020).

2.5 Sapota-do-Solimões (*Quararibea cordata* Vischer)

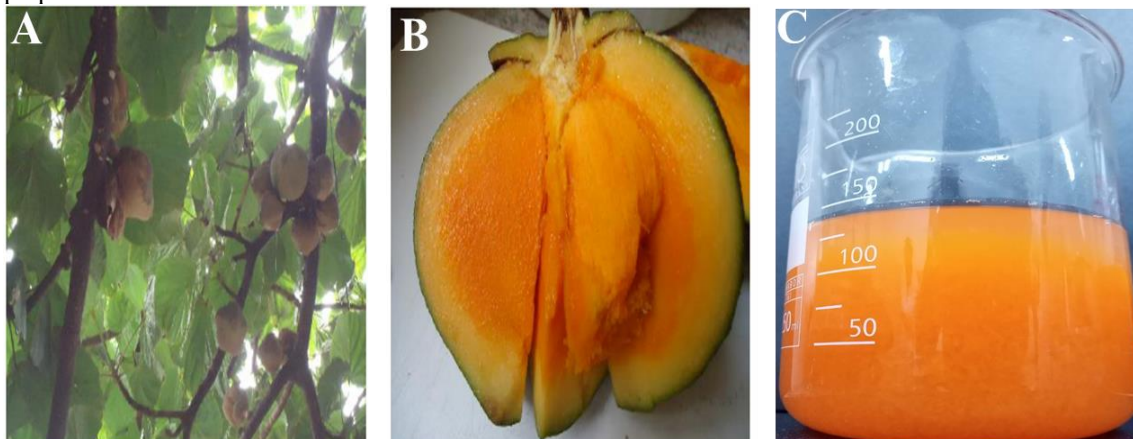
A América Tropical é fonte de frutas mundialmente conhecidas como maracujá, abacate e manga. No entanto, muitas frutas ainda desconhecidas têm propriedades notáveis para o desenvolvimento de novos produtos com altos valores nutritivos e benefícios para a saúde dos consumidores. A Amazônia brasileira possui aproximadamente 220 espécies de frutas comestíveis, que são apenas 4% da diversidade de frutas nativas (BERTO *et al.*, 2015a). Além disso, as frutas amazônicas têm propriedades nutricionais e químicas que sugerem sua aplicação na produção de alimentos funcionais, além de aditivos naturais para a indústria alimentícia.

A sapota-do-Solimões é um saboroso fruto da alta Amazônia sendo encontrada na fronteira do Brasil, Colômbia e Peru (CERÓN *et al.*, 2014). Equador e Venezuela também possuem essa fruta (JORDAN; HOYOS CONCHA, 2005). Seu nome científico é *Quararibea cordata* (Bonpl.) Vischer e tem como sinônimo *Matisia cordata*, que foram os nomes usados para pesquisa científica neste trabalho. Os frutos da família *Sapotaceae* e *Malvaceae* podem ser nomeados como sapoti ou sapota (PRANCE, 2003; RIBEIRO *et al.*, 2015). No Brasil, *Q. cordata* é cultivada na região do Alto Solimões o que traz o nome sapota-do-Solimões.

A árvore frutífera pode crescer até 40 m e a fruta pode ser globular ou ovoide com 7-15 cm de largura e 5-15 cm de diâmetro (CARVALHO *et al.*, 2014; RIBEIRO *et al.*, 2015). A polpa fibrosa com uma intensa cor laranja possui um sabor único e aroma doce. Para consumi-la retira-se a casca marrom grossa e suas sementes cuneiformes (CERÓN *et al.*, 2014). A literatura menciona diferentes sabores para a sapota-do-Solimões, como mamão, abacate, manga e até coco, demonstrando assim seu sabor único

(CARVALHO *et al.*, 2014). A Figura 2 apresenta a fruta sapota-do-Solimões ainda na árvore, cortada ao meio e como suco.

Figura 2- Sapota-do-Solimões (*Quararibea cordata* Vischer) de Goiânia Brasil. A- o fruto na árvore, B- a polpa do fruto e C- suco da fruta °Brix 2



Fonte: Carvalho, Vania Silva Damiani, Clarissa Asquiere *et al.*, (2014).

Essa fruta é utilizada por indígenas e na cidade é comercializada *in natura* em feiras e supermercados de março a junho. O peso da fruta é de aproximadamente 500 g e a árvore pode produzir mais de 6.000 frutas por ano (MONTEIRO *et al.*, 2018c). A polpa de sapota-do-Solimões possui muitas aplicações devido às suas características sensoriais e nutricionais. A fruta pode ser facilmente exportada devido à sua casca rígida. Apesar de ser produzida no norte do Brasil, a aplicação de algum processamento pode garantir o consumo da fruta em todo o mundo durante o ano todo.

Sapota-do-Solimões é desconhecida culturalmente e cientificamente fora da região Amazônica. Algumas publicações ressaltam suas propriedades e possibilidades para a produção de novos alimentos. A Tabela 1 reúne publicações encontradas com as palavras-chave *Quararibea cordata* e *Matisia cordata*. No geral, os autores caracterizaram a polpa, sementes e cascas da fruta trazendo resultados de composição química, físico-química, ácidos graxos, compostos voláteis. Além disso, a variedade de compostos bioativos com atividade antioxidante, como polifenóis e carotenoides, também é mostrada.

Tabela 1- Trabalhos publicados com palavras-chave *Quararibea cordata* e *Matisia cordata*

Título	Principais resultados	Referência
Evaluation of the fruit zapote pulp behavior (<i>Matisia cordata</i>) in agro-industrial processes of transformation	O alto teor de pectina foi um ponto favorável para a produção de geleia. Além disso, a produção de vinho foi melhorada devido ao teor de açúcar.	(JORDAN; HOYOS CONCHA, 2005)
The mineral content of tropical fruits and unconventional foods of the Andes and the rain forest of Colombia	Os macros minerais mais presentes foram K 368 mg/100g e Ca 50 mg/100g. Para micro mineral foi Fe 0,59 mg/100g.	(LETERME <i>et al.</i> , 2006)
Physicochemical characteristics of two variety zapote fruit (<i>Matisia cordata</i>) commercialized in department del Cauca	A polpa da fruta apresentou pH neutro (6-7) e um alto teor de açúcares.	(ALEGRÍA; HOYOS; PRADO, 2007)
Screening of vegetables and fruits from Panama for rich sources of lutein and zeaxanthin	Fonte de carotenoides (95 µg/g) com teor alto de zeaxantinas (46 µg/g), que estão relacionadas à saúde ocular.	(MURILLO, <i>et al.</i> , 2010)
Development and antioxidant capacity of sapota pulp jelly (<i>Quararibea cordata</i> VISCHER)	A geleia apresentou maior teor de compostos fenólicos totais (102 mg/100 g de GAE) do que a polpa da fruta (21 mg/100 g de GAE).	(CARVALHO <i>et al.</i> , 2012)
Native carotenoids composition of some tropical fruits	A fruta apresentou 22 carotenoides diferentes, incluindo β-caroteno e 10 diferentes zeaxantina-di-ésteres.	(MURILLO <i>et al.</i> , 2013)
Process synthesis for antioxidant polyphenolic compounds production from <i>Matisia cordata</i> Bonpl. (zapote) pulp	O método com maior rendimento de polifenóis (265,90 mg/100 g de GAE) foram a secagem de bandejas, extração supercrítica e membranas (ultrafiltração e nanofiltração).	(CERÓN <i>et al.</i> , 2014)
Evaluation of physical and chemical parameters of the Sapota (<i>Quararibea cordata</i> Vischer): A fruit of the Amazon Brazilian	A fruta apresentou alto teor de fibra dietética (11,94 %), carotenoides (1,91 µg.g ⁻¹) e pectina (5,24%).	(CARVALHO, <i>et al.</i> , 2014)
Bioactive compounds and scavenging capacity of pulp, peel, and seed extracts of the Amazonian fruit <i>Quararibea cordata</i> against ROS and RNS	A fruta tem potencial como fonte de compostos bioativos com alta capacidade antioxidante sendo a epicatequina (extrato de 320µg/g) o principal composto fenólico na polpa.	(BERTO <i>et al.</i> , 2015)
Evaluation of Cu, Mg, Fe and Na Metal Contents in Sapodilla Plum (<i>Quararibea cordata</i>) from Valle del Cauca, Colombia	O mineral Fe (0,47 mg/100g) e Cu (0,42 mg/100g) apresentaram maior teor, enquanto, Mg (0,003 mg/100g) o menor.	(CASTILLO; MORENO; RAMÍREZ, 2016)

Influence of preservation by heat and cold on the physicochemical and microbiological characteristics, bioactive compounds of pulp from sapota-do-Solimões (<i>Quararibea cordata</i>)	O congelamento da polpa da fruta não afetou o teor de ácido ascórbico, carotenoides totais e fenólicos totais. No entanto a atividade antioxidante diminuiu.	(MONTEIRO <i>et al.</i> , 2018b)
Ice cream production using the sapota pulp (<i>Quararibea cordata</i> Vischer).	O sorvete da sapota-do-Solimões apresentou vitamina C (4,10 mg/100g), compostos fenólicos (363,45 mg/100g de ácido gálico) e teor total de carotenoide (0,43 µg/g). O teor total de fibras de 9,33 g/100g caracterizando o sorvete como alimento funcional.	(CARVALHO; ASQUIERI; DAMIANI, 2018)
NMR spectroscopy and chemometrics to evaluate the effect of different non-thermal plasma processing on sapota-do-Solimões (<i>Quararibea cordata</i> Vischer) juice quality and composition	Aplicação de plasma atmosférico diminuiu a concentração de açúcares e aumentou a atividade antioxidante.	(SILVA <i>et al.</i> , 2022)
First complete quali-quantitative carotenoids characterization of <i>Aiphanes aculeata</i> , <i>Quararibea cordata</i> and <i>Garcinia intermedia</i> fruits	Foram identificados 12 carotenoides na polpa, sendo zeaxantina 39,6 µg/g, <i>cis</i> -anteraxanthin 16,7 µg/g e β-caroteno 14,4 µg/g os com maior concentração.	(GIUFFRIDA; TORIBIO; MURILLO, 2022)

Fonte: Elaborada pela autora.

Compostos fenólicos são moléculas que contêm pelo menos um anel aromático com um ou mais grupos hidroxila, além de outras estruturas. São antioxidantes importantes para a dieta humana encontrados em alimentos principalmente em frutas e vegetais, mas em pequenas quantidades (CERÓN *et al.*, 2014; QUATRIN *et al.*, 2020). Os compostos fenólicos podem ser aplicados como corantes naturais, antioxidantes e anti-inflamatórios. Diferentes compostos fenólicos foram identificados na sapota-do-Solimões como ácido cafeico, ácido di-cafeoil, cafeoil poliamina, proantocianidina, feruloil poliamina, kaempferol rutinosídeo, e a maior quantidade foi para epicatequina (BERTO *et al.*, 2015b).

A geleia de sapota-do-Solimões promoveu o aumento dos compostos fenólicos totais de 21 mg/100g para 102 mg/100g em equivalentes de ácido gálico. O processo a quente para produzir a geleia aumentou a bioacessibilidade dos compostos fenólicos devido à quebra da parede celular vegetal (CARVALHO, VANIA SILVA; DAMIANI, CLARISSA; ASQUIERI, 2014). A aplicação do tratamento de pasteurização seguida de congelamento ou refrigeração da polpa não alterou o teor fenólico de 9 mg/100 g de ácido gálico (MONTEIRO *et al.*, 2018b).

As frutas tropicais são fonte de carotenoides um composto bioativo com grande importância para melhorar a saúde dos olhos (MURILLO *et al.*, 2013). Sendo classificados em carotenos, compostos apenas por átomos de carbono e hidrogênio, e xantofilas, que têm oxigênio na molécula como parte de um grupo funcional como hidroxila, epóxi e carbonila (MERCADANTE *et al.*, 2017). O teor total de carotenoides encontrados na polpa sapota-do-Solimões foi de 95,4 µg/g, sendo 2,2 µg/g de luteína e 46,2 µg/g de zeaxantina. Esse teor de zeaxantina caracteriza a sapota-do-Solimões como uma fruta com um alto teor de carotenoides. A inserção de carotenoides na dieta pelo consumo de sucos de frutas é uma ótima alternativa, apesar do teor de carotenoides na polpa da fruta ser maior do que no suco foi mostrado que os carotenoides são mais biodisponível em alimentos processados, uma vez que são liberados das células durante a produção (MURILLO; MELÉNDEZ-MARTÍNEZ; PORTUGAL, 2010; YEUM; RUSSELL, 2002). Carotenoides são precursores de vitamina A, o que explica o alto teor de 1.612 UI (equivalente ao retinol) encontrado nesta fruta (BRAGA, LÚCIA FILGUEIRAS; SOUSA, MARCÍLIO PEREIRA; CAMPOS,; SÔNIA CASSINELLI BALDINI; ISEPON, JACIRA DOS SANTOS ISEPON; MARINHO, HELIDE

ALBUQUERQUE ; CASTRO, 2003). O teor de carotenoide também foi avaliado nos produtos feitos a partir da polpa como na geleia 0,048 $\mu\text{g/g}$ e sorvete 0,43 $\mu\text{g/g}$ (CARVALHO *et al.*, 2012; CARVALHO; ASQUIERI; DAMIANI, 2018).

A Tabela 2 apresenta os diferentes resultados para a composição centesimal da polpa de sapota-do-Solimões de diferentes partes do Brasil. Sapota-do-Solimões é um fruto não climatérico que sendo colhido na fase de maturidade. Diferentes estudos mostraram que essa fruta tem altos valores úmidos acima de 84 % indicando sua alta perecibilidade. Esses fatores acima implicam a necessidade de o processo industrial permitir sua comercialização em períodos não sazonal. Assim, muitos produtos podem ser feitos a partir da sapota-do-Solimões: polpa congelada, néctares, geleia, marmelada, vinho, sorvete, chá gelado, entre outros (CARVALHO *et al.* , 2012; CARVALHO; ASQUIERI; DAMIANI, 2018; GUERREIRO *et al.* , 2015; MONTEIRO *et al.* , 2018b) .

Em frutas analisadas de diferentes cidades brasileiras, o teor de proteína variou de 0,54 a 6,92. Além disso, uma avaliação importante nos sucos de frutas são as enzimas oxidativas como polifenoloxidase, que converte compostos fenólicos em quinonas instáveis. Nenhum trabalho anterior avaliou a presença de enzimas oxidativas em sapota-do-Solimões da região amazônica. Em sapota (*Pouteria sapota*) do México, a polifenoloxidase foi extraída e purificada. Esta enzima tem pH 7 como ótimo e ácido ascórbico como inibidor (PALMA-OROZCO *et al.*, 2011).

Tabela 2- Composição centesimal da polpa da sapota-do-Solimões.

Análises % (g/ 100 g)	Sapota de Goiânia, Goiás, Br (CARVALHO, VANIA SILVA ; DAMIANI, CLARISSA; ASQUIERI, 2014)	Sapota-do- Solimões de Manaus, Amazonas, Br (BERTO <i>et al.</i> , 2015a)	Sapota-do-Solimões de Manaus, Amazonas, Br (MONTEIRO <i>et al.</i> , 2018c)
Umidade	90,75 \pm 1,76	86,59 \pm 0,23	86,83 \pm 0,01
Cinzas	0,29 \pm 0,01	0,73 \pm 0,01	0,68 \pm 0,01
Proteína	0,54 \pm 0,14	0,56 \pm 0,01	0,63 \pm 0,04
Lipídio	0,18 \pm 0,00	1,03 \pm 0,02	0,22 \pm 0,05
Carboidrato	8,24 \pm 0,03	11,09 \pm 0,18	6,99 \pm 0,08
Kcal	36,74 \pm 0,16	55,87 \pm 0,00	32,48 \pm 0,29

Fonte: Elaborada pela autora.

Carboidratos são o principal composto da sapota-do-Solimões, uma vez que essa fruta é composta principalmente de sacarose (4,53%), frutose e glicose (2,48 %) (MONTEIRO *et al.*, 2018c). Apesar do alto teor de carboidratos, essa fruta tem um baixo valor calórico que varia de 32 a 55 Kcal. A polpa apresenta pH 6,8, sólidos solúveis de 12 e acidez titulável de 0,12 % (CARVALHO, VANIA SILVA; DAMIANI, CLARISSA; ASQUIERI, 2014; MONTEIRO *et al.*, 2018c). Dentre os ácidos orgânicos o ácido málico 11 mg/g e o ácido fumárico 0,17 mg/g foram quantificados no sorvete sapota-do-Solimões (CARVALHO; ASQUIERI; DAMIANI, 2018).

O teor de fibra dietética foi avaliado sendo a sapota-do-Solimões classificada como fonte de fibra implicando suas possíveis propriedades funcionais. Diferentes valores foram encontrados como em sapota-do-Solimões da região amazônica que apresentou teor total de fibras de 4,64 % sendo 0,57 % de solúvel e 4,07 % insolúvel. Além disso, o teor total de pectina foi de 5,24 g/100g, que é uma fibra solúvel como mucilagem e hemicelulose (MONTEIRO *et al.*, 2018b). Na geleia de sapota-do-Solimões de Goiânia, as fibras totais foram de 5,35 g/100g sendo 4,46 g/100g de solúvel e 0,89 g/100g de insolúvel. O teor de pectina foi de 7,67 g/100g, o que favorece a produção de géis estáveis juntamente com ácido e sacarose (CARVALHO *et al.*, 2012).

A vitamina C (ácido ascórbico) é solúvel em água e muito suscetível à degradação pós-colheita, principalmente, quando as frutas são expostas a condições adversas de manuseio e armazenamento. A polpa de sapota-do-Solimões apresenta 10,93 mg/100g de ácido ascórbico quando madura (MONTEIRO *et al.*, 2018c). Em condições de armazenamento, a polpa congelada preservou o teor de ácido ascórbico 10,72 mg/100g mais do que a polpa refrigerada 10,25 mg/100g (MONTEIRO *et al.*, 2018b).

Os lipídios variaram de 0,18 a 1,38 % na polpa sapota-do-Solimões. Dentre os lipídios, o conteúdo de ácidos graxos está descrito na Tabela 3. Ácido palmítico, ácido oleico, ácido vacênico são o mais presentes da na polpa de sapota-do-Solimões.

Tabela 3- Composição de ácidos graxos da polpa de sapota-do-Solimões em mg/100 g

Ácido graxo	Nome	(BERTO <i>et al.</i> , 2015a)	(MONTEIRO <i>et al.</i> , 2018c)
8:0	Ácido caprílico	-	-
10:0	Ácido capríco	1,0 ± 0,05	-
12:0	Ácido láurico	4,70 ± 0,22	1,76 ± 0,77
14:0	Ácido mirístico	28,10 ± 0,38	3,51 ± 1,08
15:0	Ácido pentadecílico	1,14 ± 0,07	-
15:1n-5	Ácido pentadecenóico	0,66 ± 0,01	-
16:0	Ácido palmítico	374,07 ± 87,92	68,64 ± 2,50
16:1n-9	Ácido 7-hexadecenenóico	5,50 ± 0,09	-
16:1n-7	Ácido palmitoleico	32,42 ± 4,30	12,89 ± 1,93
16:1n-5	Ácido palmitvacênico	0,62 ± 0,08	-
17:0	Ácido margárico	2,49 ± 0,64	-
17:1n-7	Ácido 10-heptadecenóico	26,49 ± 0,29	-
18:0	Ácido esteárico	30,53 ± 14,08	4,28 ± 0,19
18:1n-9	Ácido oleico	607,57 ± 253,77	66,49 ± 2,71
18:1n-7	Ácido vacênico	109,60 ± 3,60	30,55 ± 0,96
18:2n-6	Ácido linoleico	60,87 ± 3,89	6,42 ± 1,62
18:3n-6	Ácido- γ - linoleico	-	-
18:3n-3	Ácido α -linolênico	98,60 ± 7,77	18,11 ± 1,76
20:0	Ácido araquidônico	1,98 ± 0,71	-
20:1n-9	Ácido eicosonóico	3,87 ± 0,59	-
21:0	Ácido heneicosílico	-	-
20:2n-6	Ácido eicosadienoico	0,30 ± 0,01	-
20:3n-6	Ácido dihomo- γ - linoleico	-	-
20:3n-3	Ácido eicosatrienóico	0,50 ± 0,14	-
20:4n-6	Ácido araquidônico	-	-
22:0	Ácido beénico	5,14 ± 0,06	-
20:5n-3	Ácido eicosapentaenóico	0,70 ± 0,01	-
22:1n-9	Ácido erúico	0,25 ± 0,01	-
22:2n-6	Ácido docosadienóico	13,08 ± 0,27	-
24:0	Ácido lignocérico	7,14 ± 0,45	-
24:1n-9	Ácido nervônico	0,78 ± 0,03	-
22:6n-3	Ácido docosahexaenóico	2,66 ± 0,03	-
Σ TFA	Ácido graxo total	1402,96	-
Σ SFA	Ácidos graxos saturados	438,49	78,19
mufa Σ	Ácidos graxos monoinsaturados	787,76	-
Σ PUFA	Ácidos graxos poli-insaturados	176,71	-
Σ n-9	Ômega-9	617,97	-
Σ n-6	Ômega-6	74,25	-
Σ n-3	Ômega-3	102,46	-
PUFA/SFA		0,40	-
n-6/n-3		0,72	0,35

Fonte: Elaborada pela autora.

O sabor da fruta é um dos principais atributos sensoriais de aceitação do consumidor, sendo a mistura de várias moléculas voláteis que trazem aromas únicos para as frutas. Os compostos voláteis são originados a partir da síntese ou degradação de moléculas maiores, como carotenoides que geram terpenos. No entanto, a maioria é formada a partir de lipídios através da atividade lipoxigenase ou degradação oxidativa de ácidos linoleicos e linolênicos, como ésteres e álcoois. Classes diferentes de compostos voláteis foram encontradas na polpa sapota-do-Solimões sendo os mais relevantes álcoois, aldeídos, ésteres, furanos, cetonas e terpenos. Durante o amadurecimento da fruta, foi visto que dentre os compostos voláteis o etanol aumenta sua concentração. Além disso, os aromas verdes e herbáceos presentes na polpa se devem à presença de hexanol e (Z)-3-hexen-1-ol que são formados a partir do metabolismo de ácidos graxos. As cetonas dão o aroma de acetoína que se assemelha à manteiga e creme e são biossintéticos e/ou degradados de ácidos graxos por β -oxidação. Os outros compostos são responsáveis pelo aroma frutado da sapota-do-Solimões (MONTEIRO *et al.*, 2018c)

Compostos bioativos podem interagir sinergicamente ou separadamente para combater espécies reativas de oxigênio (ROS) e espécies reativas de nitrogênio (RNS). Os compostos fenólicos e carotenoides apresentados na polpa sapota-do-Solimões têm a propriedade de combater ROS e RNS, inibindo ou diminuindo a taxa de reações oxidativas. A capacidade antioxidante da polpa de sapota-do-Solimões foi avaliada contra diferentes radicais por BERTO, *et al.* (2015b). Para o radical superóxido ($O_2^{\bullet-}$) a capacidade de antioxidante da polpa foi 18,5%, apesar de não ser um forte oxidantes este radical é um importante precursor de outros radicais (hidroxila, oxigênio singlete e peróxido de hidrogênio). Os antioxidantes da polpa de sapota-do-Solimões diminuíram o poder oxidante do peróxido de hidrogênio (H_2O_2) em 32 %, este radical tem baixo poder de reatividade, mas sua capacidade de entrar nas células e reagir com metais pode produzir o radical mais prejudicial, hidroxila. Dentre os ROS, o ácido hipocloroso (HOCl) é o mais reativo e a polpa da fruta apresentou concentração inibitória (IC_{50}) para diminuir 50% o efeito oxidante das ROS de 22 $\mu g/mL$. Os extratos da polpa foram mais seletivos para ROS do que para RNS. Para RNS, o IC_{50} foi 369 $\mu g/mL$ para o óxido nítrico ($^{\bullet}NO$) e 152 $\mu g/mL$ para peroxinitrito ($ONOO^-$).

Minerais são elementos essenciais na dieta humana a polpa de sapota-do-Solimões têm uma variedade de minerais em sua composição. O maior teor é relatado

para Mg, K, Na, P e Ca. No entanto, Mn, Zn, Fe, Cu, Cl, S, Cr e Ni foram encontrados em menores concentrações (BERTO *et al.*, 2015a; LETERME *et al.*, 2006).

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Desenvolver sucos funcionais de sapota-do-Solimões a partir da fermentação com o probiótico *L. casei* B-442 com e sem a adição de frutooligossacarídeos e avaliar a viabilidade durante a digestão *in vitro*, assim como o efeito na microbiota intestinal.

3.2 Objetivo específico

- Produzir o suco funcional de sapota-do-Solimões probiótico fermentado por *L. casei* B-442;
- Produzir o suco funcional de sapota-do-Solimões simbiótico adicionado de FOS e fermentado por *L. casei* B-442;
- Avaliar a viabilidade do *L. casei* B-442 durante o armazenamento a frio (4 °C) e durante a digestão *in vitro*;
- Avaliar o consumo de açúcar, produção de ácidos orgânicos e de ácidos graxos de cadeia curta durante o armazenamento a frio;
- Avaliar a bioacessibilidade de ácido ascórbico durante o armazenamento a frio e durante a digestão *in vitro*;
- Avaliar o efeito do suco simbiótico de sapota-do-Solimões, antes e após armazenamento, na microbiota intestinal humana;
- Avaliar a concentração do FOS durante o armazenamento, durante a digestão *in vitro* e fermentação colônica.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Suco de sapota-do-Solimões

A polpa de sapota-do-Solimões foi doada pela Universidade Federal do Amazonas. Para o preparo do suco, a polpa foi descongelada e misturada em liquidificador doméstico. Então, água foi adicionada até atingir o °Brix 2 e o pH final 6. Por fim, o suco foi dividido em embalagens plásticas (150 mL) e congelado para ser usado durante o desenvolvimento dos experimentos da tese.

4.2 Preparo do inóculo *Lacticaseibacillus casei* B-442

Lacticaseibacillus casei B-442 (*Lactobacillus casei* NRRL B-442) foi doada pela ARS Culture Collection (NRRL, Peoria, Illinois - USA) umas das maiores coleções de microrganismos disponível publicamente no mundo. Para a ativação a cultura de estoque de *L. casei* B-442 foi incubada estaticamente a 37 °C em 100 mL de caldo MRS (De Mann, Rogosa e Sharpe) contendo 10 mL tampão fosfato de potássio dibásico 200mM em pH 6,5 durante a noite (15h). O inóculo (1 %, v/v) foi propagado em 100 mL de caldo MRS a 37 °C por aproximadamente 5 h para obter uma concentração celular inicial de aproximadamente 9,0 log UFC/mL. Verificado através do valor do pH 5,2 aproximadamente e absorvância equivalente a 0,600 de absorvância a 590 nm.

4.3 Fermentação dos sucos funcionais de sapota-do-Solimões

O suco de sapota-do-Solimões simbiótico foi inicialmente adicionado de 7g/100mL do prebiótico FOS (P95 de Beneo Oraft, Alemanha) que contém 7 GP sendo 28% de 1-kestose, 27% de nistose, 20% de fructofuranosilnistose, 16% da GP 6 e 9% da GP 7 (ALMEIDA *et al.*, 2017). O suco de sapota-do-Solimões probiótico sem adição de FOS e o simbiótico foram fermentados em garrafas de vidro transparentes com tampas rosqueadas (250 mL). O processo de fermentação foi realizado de forma estática em uma incubadora a 37 °C, após o inoculo de 1% (v/v) de *L. casei* B-442 (aproximadamente 9,0 log UFC/mL). A fermentação ocorre durante 15 h com pH final de aproximadamente 3,5, definido com base em trabalhos anteriores (PEREIRA *et al.*, 2017a; PEREIRA; MACIEL; RODRIGUES, 2011; SANTOS FILHO *et al.*, 2019).

A fermentação em caldo MRS também foi simulada nas mesmas condições que os sucos funcionais para comparar o efeito da matriz na sobrevivência do microrganismo probiótico. Além disso, o suco de sapota-do-Solimões foi adicionado de *L. casei* B-442 (aproximadamente 9,0 log UFC/m) sem fermentar para saber o efeito apenas dos componentes do suco sem o processo fermentativo na sobrevivência do microrganismo probiótico. Foi feito um teste em ágar MRS para verificar a presença de bactérias lácteas viáveis do suco *in natura* sem adição de *L. casei* B-442, não apresentando contagem de viáveis (APÊNDICE A - Avaliação da contagem de viáveis em suco de sapota-do-Solimões *in natura*).

Após a fermentação, o pH e °Brix foram medidos, e a viabilidade foi avaliada. Na Tabela 4, estão descritas as siglas usadas para se referir aos sucos funcionais desenvolvidos nesse trabalho.

Tabela 4- Identificação dos sucos funcionais de sapota-do-Solimões

Sigla	Amostra
SSP	Suco de sapota-do-Solimões probiótico
SSS	Suco de sapota-do-Solimões simbiótico
SSNF	Suco de sapota-do-Solimões não fermentado e adicionado de <i>L. casei</i> B-442 (9,0 log UFC/mL)
SSI	Suco de sapota-do-Solimões <i>in natura</i>
SSS0	Suco de sapota-do-Solimões simbiótico antes do armazenamento
SSS30	Suco de sapota-do-Solimões simbiótico depois de 30 dias de armazenamento

Fonte: Elaborada pela autora.

4.4 Determinação da viabilidade

A viabilidade das células de *L. casei* B-442 foi executada segundo Morais *et al.* (2019) com algumas modificações descritas a seguir. As amostras de suco funcional foram diluídas seriadamente com água peptonada (10^{-1} - 10^{-9}) pipetadas e agitadas vigorosamente. Posteriormente, 10 µL de cada diluição foi inoculado em placas com ágar MRS (triplicata) utilizando a técnica de inoculação de microgota. As placas foram incubadas por 48h a 37 °C em aerobiose e a viabilidade foi expressa como log UFC/mL.

4.5 Armazenamento a 4 °C

Os sucos funcionais de sapota-do-solimões SSP e SSS foram armazenados por 30 dias a 4 °C. Ao fim do período os sucos funcionais foram analisados.

A taxa de sobrevivência foi calculada de acordo com a equação 1 durante o armazenamento (SOARES *et al.*, 2019).

$$Survival\ rate\ (\%) = \frac{\log\ final}{\log\ initial} \times 100 \quad (1)$$

4.6 Sobrevivência do *L. casei* B-442 em diferentes matrizes através de digestão *in vitro*

A sobrevivência do *L. casei* B-442 em diferentes matrizes através de condições gastrointestinais foi avaliada utilizando-se um modelo *in vitro* amplamente utilizado para avaliar o comportamento de probióticos com algumas modificações (ALMADA-ÉRIX *et al.*, 2021). O sistema mimetiza as condições gástricas, duodenal e jejunal em três biorreatores (300 mL) controlados por um sistema BIO-TEC-PRO com bombas peristálticas para simular os movimentos peristálticos durante a transferência, agitação automática (TE-2003-0,36-E1) em 250 rpm, e banho termostático (TEC-BIO-T) a 37 °C. O caldo MRS fermentado (condições ótimas para *L. casei* B-442), SSNF (efeito dos componentes do suco) e SSI (bioacessibilidade de compostos bioativos) também foram avaliados por meio da digestão simulada *in vitro*.

As condições gástricas foram simuladas usando 240 mg de pepsina (600 U/mL, Sigma Aldrich) diluída em 100 mL de solução contendo NaCl (47,2 mmol/L), KCl (6,9 mmol/L), KH₂PO₄ (0,9 mmol/L), MgCl₂ 6H₂O (0,1 mmol/L), NaHCO₃ (25 mmol/L), CaCl₂ (0,3 g/L). O pH foi ajustado com 1M HCl ou 1M NaOH para pH 2,3 ± 0,2. As condições duodenais foram simuladas usando 0,9 g de pancreatina/L (Sigma Aldrich) e 6 g/L de sais biliares (Sigma Aldrich) diluídos em 60 mL de solução contendo NaCl (38,04 mmol/L), KCl (6,8 mmol/L), KH₂PO₄ (0,64 mmol/L), MgCl₂ 6H₂O (0,33 mmol/L), NaHCO₃ (85 mmol/L), CaCl₂ (0,37 g/L). O pH foi ajustado com 1M HCl ou 1M NaOH para pH 5,0 ± 0,3. Por fim, as condições jejunais foram simuladas utilizando 0,9 g de pancreatina/L (Sigma Aldrich) e 6 g/L de sais biliares (Sigma Aldrich) diluídos em 50 mL de solução contendo NaCl (38,4 mmol/L), KCl (6,8 mmol/L), KH₂PO₄ (0,64

mmol/L), $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (0,33 mmol/L), NaHCO_3 (85 mmol/L), CaCl_2 (0,37 g/L). O pH foi ajustado com 1M HCl ou 1M NaOH para $7,0 \pm 0,3$.

O volume inicial da amostra foi de 190 mL que foi bombeado por 10 minutos para o sistema de digestão. Cada fase durou 2h, após a primeira hora foi iniciada a transferência para a próxima fase, durante 1 h transferindo 240 mL da fase gástrica para fase duodenal. Então, foi transferido 260 mL da duodenal para a fase jejunal. As amostras foram coletadas no final de cada fase gástrica, duodenal e jejunal. Então, foram avaliadas quanto a viabilidade do probiótico, AGCC, bioacessibilidade do ácido ascórbico e estabilidade do FOS.

4.7 Fermentação colônica

4.7.1 Aspectos Éticos

Para seleção dos voluntários foram estabelecidas as seguintes condições: não fumantes, sem doenças metabólicas e gastrointestinais, não ingestão de antibióticos, suplementos prebióticos ou probióticos por pelo menos 3 meses antes da doação. Então os voluntários assinaram o termo de consentimento livre e esclarecido como demonstrado no APÊNDICE B - Termo de consentimento livre e esclarecido para estudo da microbiota intestinal Todos os procedimentos experimentais foram submetidos e aprovados pelo Comitê de Ética em Pesquisa (Universidade Federal do Ceará, CEP/UFC, CAAE 51874021.0.0000.5054, 25/10/2021).

As amostras fecais de duas voluntárias saudáveis de 29 anos (SSS0) e 27 anos (SSS30) foram coletadas em recipientes estéreis e mantidas a sob refrigeração até o momento da inoculação.

4.7.2 Fermentação colônica do suco de sapota-do-Solimões simbiótico

O efeito do SSS na microbiota intestinal foi avaliado através da fermentação colônica simulando condições gastrointestinais usando um modelo *in vitro* com algumas modificações descritas abaixo (ALMADA-ÉRIX *et al.*, 2021). O processo foi realizado em biorreator batch (TecBioFlex, 1 L) sob condições controladas (37°C). Devido à alta

concentração de fibras no suco de sapota-do-Solimões a agitação foi mantida em 200 rpm. As condições gástricas (pH $2,3 \pm 0,2$) foram simuladas usando 480 mg (600 U/mL) de pepsina (Pepsina P700, Sigma Aldrich) diluída em 200 mL de solução contendo NaCl (47,2 mmol/L), KCl (6,9 mmol/L), KH_2PO_4 (0,9 mmol/L), $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (0,1 mmol/L), NaHCO_3 (25 mmol/L), CaCl_2 (0,3 g/L). Assim, 380 mL de suco funcional (SSS0 e SSS30) foram adicionados e mantidos nesta condição por 2h. Em seguida, foram retirados 100mL da fase gástrica. As condições duodenais (pH $5,0 \pm 0,3$) foram simuladas usando 1,8 g de pancreatina/L (pancreatina de pâncreas suíno P3292, Sigma Aldrich) e 12 g/L de bile (bile bovina B3883, Sigma Aldrich) diluída em 120 mL de solução contendo NaCl (38,4 mmol/L), KCl (6,8 mmol/L), KH_2PO_4 (0,64 mmol/L), $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (0,33 mmol/L), NaHCO_3 (85 mmol/L), CaCl_2 (0,37 g/L). Após 2h nesta condição, foram retirados 100mL da fase duodenal. Finalmente, as condições jejunais (pH $7,0 \pm 0,3$) foram simuladas pela adição de 100 mL de solução duodenal. As amostras fecais foram diluídas 1:10 (p/p) em tampão anaeróbico (solução salina fosfato 0,1 M, pH 7,0) e depois inoculadas (10% v/v). As condições anaeróbicas foram mantidas injetando 100% de gás nitrogênio no líquido usando o reator de aspersão. A fermentação colônica foi realizada por 48 h. As amostras foram coletadas em 0, 24 e 48h de fermentação. As amostras foram centrifugadas (1000*g, 4°C, 10 min) e o sobrenadante foi analisado quanto ao teor de açúcar, ácidos orgânicos, AGCC e FOS. O precipitado foi congelado e reservado para a análise de DNA genômico.

4.8 Análise do DNA da microbiota intestinal

As amostras do suco SSS0 e SSS30 0h e 48h foram transferidas (40 mL) para tubos plástico estéreis e centrifugadas (1000*g, 4 °C, 10 min). O DNA genômico foi extraído a partir de 0,25g (peso úmido) usando o kit comercial DNeasy PowerSoil Pro Kit (QIAGEN) de acordo com as recomendações do fabricante. A quantidade e concentração do DNA genômico foi estimada por medida da absorbância em 260 nm, utilizando o espectrofotômetro NanoDrop 2000 (Thermo Scientific, Waltham, Massachusetts, EUA). A qualidade do material obtido foi avaliada pela razão entre as medidas de absorbância 260/280 e 260/230. As bibliotecas foram preparadas utilizando o protocolo *16S Metagenomic Sequencing Library Preparation* da Illumina (Illumina, San Diego, CA, EUA), com algumas modificações. A região V4 do gene 16S rRNA foi

amplificada usando 2X Kapa HiFi HotStart Ready Mix (Roche, Pleasanton, CA, EUA) com *primers* específicos (515F-Y/806R), de acordo com o seguinte programa: 95°C por 3 min, seguido por 35 ciclos de 98°C por 20 seg, 55°C por 30 seg, 72 min°C por 30 seg, e 72 °C por 5 min (PARADA; NEEDHAM; FUHRMAN, 2016). Em seguida, as bibliotecas foram purificadas com o Agencourt AMPure XP (Beckman Coulter, Brea, CA, EUA) e a indexação realizada utilizando o kit de index Nextera XT (*set A*) (Illumina). Depois da indexação, os produtos de PCR foram purificados com o Agencourt AMPure XP-PCR (Beckman Coulter, Brea, CA, EUA) e quantificados usando dsDNA BR kit (Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA) em um fluorômetro Qubit 2.0 (Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA). As amostras foram submetidas ao sequenciamento utilizando o reagente *MiSeq kit v2* (300 ciclos) na plataforma Illumina *MiSeq System* (Illumina, San Diego, CA, EUA). O sequenciamento foi realizado na Central de Genômica e Bioinformática (CeGenBio), da Universidade Federal do Ceará.

Os dados foram analisados utilizando o *BaseSpace*, uma plataforma em nuvem da *Illumina* composta por vários aplicativos baseados em softwares utilizados na bioinformática para análise de sequências. Nesta plataforma os dados do sequenciamento foram transmitidos para a nuvem para ser tratados pelo software DADA2. Os dados foram desmultiplexados e, em seguida, filtrados, limpos, e mesclados sem quimeras.

4.9 Alfa diversidade

A alfa diversidade da microbiota intestinal inoculada e após fermentação colônica (48h) dos sucos funcionais foram calculados usando o estimador de riqueza de Chao1 e o índice de diversidade de Shannon. As análises de alfa diversidade foram realizadas no programa EstimateS.

4.10 Análise por cromatografia líquida de alto desempenho

4.10.1 Preparo das amostras

As amostras foram previamente centrifugadas (11.180*g, 20 °C, 10 min), depois 2,0 mL foi filtrado com membrana de acetato de celulose (0,45 µM, 13 mm de diâmetro) e colocadas em *vials*.

4.10.2 Determinação de ácidos orgânicos e ácidos graxos

A concentração dos ácidos orgânicos ascórbico, cítrico, acético, láctico e ácidos graxos de cadeia curta propiônico, butírico e isobutírico nas amostras (SSI, SSP e SSS) foram analisadas por cromatografia líquida de alto desempenho (Agilent Technologies 1260 Infinito). O volume de injeção foi de 40 µL e a separação cromatográfica foi realizada utilizando uma coluna Aminex HPX-87H (300 × 7,8 mm) (Bio-Rad) a 65 °C. A eluição isocrática foi realizada com ácido sulfúrico de 5 mM em água deionizada como fase móvel por 30 min a 0,6 mL/min (PEREIRA *et al.*, 2017a). Os ácidos foram detectados utilizando um detector UV-DAD a 210 nm nos seguintes tempos de retenção de 9,66 min (ascórbico), 7,8 min (cítrico), 14,9 min (acético) e 12,5 min (láctico), propiônico (17,2), butírico (21,2) e isobutírico (18,8). A curva de calibração foi estabelecida usando os padrões de cada ácido. Assim, ácido ascórbico e cítrico variaram de 0,1 a 1,0 g/L, acético variou de 0,1 a 6,0 g/L, e 0,8 a 8,0 g/L. Os resultados foram expressos em g/L.

4.10.3 Determinação dos açúcares

A concentração de glicose, frutose e sacarose nas amostras (SSI, SSP e SSS) foi analisada utilizando cromatografia líquida de alto desempenho (Agilent Technologies 1260 Infinity) segundo Pereira, *et al.* (2013a), com algumas modificações. O volume de injeção foi de 40 µL e a separação cromatográfica foi realizada utilizando uma coluna Aminex HPX-87C (300× 7.8 mm) a 80 °C. A eluição isocrática foi realizada com água por 30min a 0,6 mL/min. A detecção nos seguintes tempos de retenção da sacarose 9,7 min, glicose 11,89 min e frutose 15,33 min foi feita utilizando-se um detector de RI a 35

°C. A curva de calibração foi estabelecida utilizando padrões de sacarose, glicose e frutose variando de 0,5 a 10 g/L. Os resultados foram expressos em g/L.

4.11 Avaliação por densitometria do grau de polimerização dos frutooligossacarídeos

Os FOS no SSS foram analisados por cromatografia de camada delgada (TLC) e densitometria. As amostras do SSS foram diluídas para que todas estivessem diluição e permitisse a comparação. Então, filtradas com membrana de acetato de celulose (0,45 µM, 13 mm de diâmetro). As amostras foram analisadas por TLC, utilizando placas de sílica em gel (SIGMA-ALDRICH 20 × 20 cm, número: 99570-25EA). Foram aplicadas amostras de 1 µL na placa a 1,5 cm da parte inferior e a uma distância de separação de 1,0 cm uma da outra. As placas foram colocadas na câmara de desenvolvimento das placas de TLC pré-condicionada a 30 °C. Para separar os carboidratos, a placa de TLC foi desenvolvida três vezes em um sistema solvente contendo n-butanol/2-propanol/H₂O (10:5:4). Após cada subida do solvente de aproximadamente 4h, a placa era seca com ar quente. Para visualizar as bandas de carboidratos, a placa de TLC foi imersa em uma câmara contendo uma solução reveladora composta de 1-butanol/água (80%, v/v), ácido fosfórico (6,78 mL), uréia (3 g) e etanol (8 mL) em 100 mL. Após a secagem em ar frio, as placas foram aquecidas a 120 °C por 10 minutos para tornar as bandas visíveis. Para a quantificação dos FOS, utilizou-se um scanner TLC CAMAG 4 20 × 20 cm acoplado ao densitômetro. O comprimento de onda usado foi de 450 nm. O software Planar WinCATS Chromatography Manager foi usado para avaliar os dados (ALMEIDA *et al.*, 2017; SHIOMI; ONODERA; SAKAI, 1997). Os resultados foram expressos como concentração relativa do FOS de acordo com a equação 2 ou como concentração relativa do GP do FOS de acordo com a equação 3.

$$\text{Concentração relativa do FOS \%} = \frac{A_{GP}}{A_{GPi}} \times 100 \quad (2)$$

Em que:

A_{GP} é a área cromatográfica de um GP do FOS (GP = 3 a 7)

A_{GPI} é a área cromatográfica do GP do FOS inicial

$$\text{Concentração relativa do GP do FOS \%} = \frac{A_{GPI}}{A_t} \times 100 \quad (3)$$

Em que:

A_{GPI} área cromatográfica de cada GP do FOS ($i= 3$ to 7)

A_t é a soma das áreas GP do FOS ($\sum_{i=3}^7 A_i$)

4.12 Determinação de fenólicos totais

A quantificação de fenólicos totais foi realizada por espectroscopia como descrito abaixo (PAIXÃO *et al.*, 2019; SINGLETON; ROSSI, 1965). A análise foi realizada em uma microplaca de 96 poços adicionando 10 μ L do sobrenadante da amostra (11.180*g, 2 min a 20 °C) com 200 μ L de solução de Folin, seguido de agitação. Após 3 min, 100 μ L de solução de bicarbonato de sódio (4%, p/v) foi adicionado e foi medido a absorbância em 765 nm usando um leitor de microplacas ELISA. A concentração de fenólicos totais foi calculada a partir de uma curva de calibração com soluções de concentrações conhecidas de ácido gálico (0-800 mg/L) contra absorbância a 765 nm. O resultado foi expresso como concentração relativa de fenólicos totais.

4.13 Bioacessibilidade do ácido ascórbico

As frações dos sucos funcionais após cada fase da digestão foram avaliadas quanto a concentração de ácido ascórbico. As amostras foram previamente centrifugadas (11.180*g, 20 °C, 10 min) e quantificadas por HPLC (item 4.11.2). A bioacessibilidade do ácido ascórbico foi calculada de acordo com a equação 4:

$$\text{Bioacessibilidade (\%)} = \frac{\text{Amostra após digestão}}{\text{Amostra antes da digestão}} \times 100 \quad (4)$$

A amostra após digestão é a amostra retirada após exposta a condições de digestão *in vitro*. Amostra antes da digestão é aquela que não foi exposta a condições de digestão *in vitro*.

4.14 Parâmetros de cor

Os parâmetros de cor foram obtidos utilizando-se um colorímetro CR300 (Konica Minolta, Japão), de acordo com a escala CIELAB (L^* , a^* , b^* , C^* e h°). O equipamento foi calibrado com um D65 padrão branco ($L^* = 97,81$, $a^* = -0,06$, $b^* = 1,64$, $C^* = 1,64$ e $h^\circ = 92,17$). A luminosidade do parâmetro (L^*), avermelhado-esverdeado (a^*), amarelado-azulado (b^*), cromática (C^*) e o ângulo da tonalidade (h°) foram medidos através de uma área de visualização de 8mm. A diferença de cor (ΔE) foi obtida de acordo com a equação 5. A variação dos parâmetros de cor (Δ) foi calculada como a diferença entre o valor do suco após fermentação e o suco *in natura*.

$$\Delta E = \sqrt{(\Delta L^*)^2 + (\Delta a^*)^2 + (\Delta b^*)^2} \quad (5)$$

4.15 Análises estatísticas

Os resultados foram analisados e relatados como média e desvio padrão. Quando apropriado, as variáveis foram submetidas a uma análise ANOVA unidirecional seguida do teste de comparações múltiplas de Tukey com um nível de significância de 5% ($p \leq 0,05$) utilizando o programa STATISTICA (Statsoft v 13.0).

Um *heatmap* foi usado para mostrar a distribuição dos gêneros em relação ao tempo de estocagem e fermentação colônica do SSS usando o MetaboAnalyst 5.0 (www.metaboanalyst.ca/). Foram identificadas 814 espécies de microrganismos, sendo 595 de SSS0 e 495 de SSS30. Portanto, devido à complexidade do conjunto de dados e a particularidade de cada tipo de amostra, uma matriz numérica foi criada separadamente para as amostras antes e após 30 dias de armazenamento. Cada matriz numérica foi importada separadamente pelo programa PLS Toolbox™ (versão 8.6.2, Eigenvector Research Incorporated, Manson, WA EUA) para análise quimiométrica não supervisionada por Análise de Componentes Principais (PCA) para explorar a variabilidade de espécies dos microrganismos no SSS com base no armazenamento

refrigerado e o tempo de fermentação colônica. Para a abordagem quimiométrica, os conjuntos de dados foram auto escalonados (centrados na média com posterior escalonamento de variância) e o algoritmo *Simplified PLS* (SIMPLS) foi aplicado para decompor as matrizes complexas em escores e *loadings*. O método de validação cruzada completa por *Venetian blind* (10 divisões e espessura igual a 1) foi usado para modelagem com um nível de confiança de 95% (SILVA *et al.*, 2022).

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Viabilidade do *L. casei* B-442 em diferentes matrizes

Na Tabela 5, a contagem inicial após fermentação para as matrizes avaliadas foi acima de 11 log UFC/mL, superior ao recomendado (6-7 log UFC/mL) para ser considerado probiótico (SWANSON *et al.*, 2020; VALERO-CASES; NUNCIO-JÁUREGUI; FRUTOS, 2017). A cepa probiótica demonstrou boa capacidade de metabolizar os açúcares do suco sapota-do-Solimões mesmo após a adição de FOS (SSS), já que a contagem inicial dos dois sucos funcionais (SSP e SSS) foi semelhante ao caldo MRS. Outros estudos já demonstraram a capacidade do *L. casei* B-442 em se propagar em diferentes sucos de frutas. Dentre as matrizes se destacam cacau (*Theobroma cacao* L.), melão, abacaxi, caju e cupuaçu (*Theobroma grandiflorum*) que apresentaram contagens superiores a 9 log UFC/mL (COSTA *et al.*, 2013a; FONTELES *et al.*, 2012; PEREIRA *et al.*, 2013b, 2017a; SANTOS FILHO *et al.*, 2019).

Tabela 5- Viabilidade do probiótico *L. casei* B-442 após fermentação (15 h; 37 °C) em diferentes matrizes

	Caldo MRS	SSP	SSS
pH	3,95 ± 0,05 ^b	3,45 ± 0,04 ^c	3,45 ± 0,01 ^a
log UFC/mL	12,55 ± 0,03 ^a	11,06 ± 0,10 ^c	11,52 ± 0,07 ^b

Letras diferentes na mesma linha indicam diferenças estatisticamente significativas ($p \leq 0,05$). Suco de sapota-do-Solimões probiótico (SSP) e suco de sapota-do-Solimões simbiótico (SSS). Fonte: Elaborada pela autora.

Além disso, BAL tendem a preferir um ambiente redutor, para promover o crescimento celular. Foi demonstrado que a suplementação do leite com o agente redutor ácido ascórbico (50-500 mg/L) diminuiu o tempo de fermentação em 20 h para *L. casei* NRRL B-1922 (SOTO *et al.*, 2019). A variedade de compostos bioativos presentes no suco de sapota-do-Solimões pode ter promovido esse ambiente redutor já que sua polpa tem 10,93 mg/100g de ácido ascórbico (MONTEIRO *et al.*, 2018c). No entanto, outros compostos ácidos e as fibras podem exercer um efeito protetor promovendo o crescimento dos microrganismos. Isso foi demonstrado em suco de laranja probiótica fermentado por *L. paracasei ssp. paracasei* (*L. casei*-01), no qual a adição de ácido ascórbico não exerceu um efeito protetor sobre as culturas probióticas, mas sim a acidez e o conteúdo em fibras (DA COSTA *et al.*, 2017). A polpa da sapota-do-Solimões é fibrosa caracterizada por seu elevado teor de pectina, que exerce efeito prebiótico na microbiota autóctone (CARVALHO, VANIA SILVA; DAMIANI, CLARISSA; ASQUIERI, 2014; ELSHAHED *et al.*, 2020).

O probiótico no SSS obteve uma viabilidade maior que no SSP, provavelmente a adição de FOS (7 % *p/v*) promoveu essa maior viabilidade devido ao seu efeito protetor diante de condições de estresse como a acidez. O farelo de trigo promoveu uma maior viabilidade de *L. paracasei* K5 em suco simbiótico de cereja cornalina (*Cornus mas* L.) (MANTZOURANI *et al.*, 2019). A adição de FOS em bebidas mistas de milho e arroz aumentou a viabilidade de três cepas (*L. plantarum* CCMA 0743, *Torulaspota delbrueckii* CCMA 0235, e *L. acidophilus* LACA 4) quando comparada com a bebida sem prebiótico (FREIRE; RAMOS; SCHWAN, 2017).

5.2 Viabilidade do *L. casei* B-442 em diferentes matrizes durante digestão *in vitro*

A viabilidade do probiótico *L. casei* B-442 em diferentes matrizes ao longo da digestão simulada *in vitro* é mostrada na Tabela 6. As células de *L. casei* B-442 no caldo MRS, adequado para a propagação de BAL, na fase gástrica diminuíram 9 ciclos log (3,65 log UFC/mL), e em condições entéricas a contagem foi abaixo do limite de quantificação (< 1 log UFC/mL). O caldo MRS funcionou como um controle, pois traz apenas as condições ideais para o crescimento das BAL, e a resistência através do trato gastrointestinal depende também da interação da matriz com cepa. Por exemplo, *B. lactis*

Bb-12 quando adicionado na ricota de leite de cabra manteve a viabilidade em 6 log UFC/mL durante digestão *in vitro*, mas quando avaliado em caldo MRS a viabilidade caiu para menos de 2 log UFC/mL (MEIRA *et al.*, 2015).

Tabela 6- Viabilidade do probiótico *L. casei* B-442 durante a digestão simulada *in vitro* em diferentes matrizes

	Fases da digestão <i>in vitro</i> (log UFC/mL)		
	Gástrica	Duodenal	Jejunal
Caldo MRS	3,65 ± 0,16 ^b	<1 ^c	<1 ^c
SSP	5,42 ± 0,10 ^b	3,78 ± 0,18 ^c	3,67 ± 0,19 ^c
SSS	3,63 ± 0,06 ^d	4,48 ± 0,18 ^c	8,59 ± 0,21 ^a
SSNF	9,48 ± 0,10 ^b	7,52 ± 0,07 ^c	5,97 ± 0,22 ^d

Letras diferentes na mesma linha indicam diferenças estatisticamente significativas ($p \leq 0,05$). Suco de sapota-do-Solimões probiótico (SSP), suco de sapota-do-Solimões simbiótico (SSS) e suco de sapota-do-Solimões não fermentado adicionado de *L. casei* B-442 (SSNF). Fonte: Elaborada pela autora.

O SSP e SSS obtiveram resultados distintos durante a digestão *in vitro*, reforçando o benefício que os componentes da matriz podem causar nas células probióticas. SSP reduziu 6 ciclos log, enquanto SSS 8 ciclos log na fase gástrica. O pH é um ponto crítico na sobrevivência de BAL durante o processo de digestão. Foi demonstrado que a adição de inulina ao meio proporcionou uma maior sobrevivência da cepa de *L. casei* L1 sob condições gástricas em pH 3, mas ao diminuir o pH para 2 as células probióticas não sobreviveram (TULUMOĞLU; ERDEM; SIMŞEK, 2018).

SSP reduziu 2 ciclos log de *L. casei* B-442 na fase duodenal mantendo na fase jejunal 3,67 log UFC/mL. A redução da viabilidade de probióticos, quando expostas a condições entéricas, é causada pela ação de sais biliares que agem como detergentes causando danos celulares e citotoxicidade (ARNOLD *et al.*, 2018). O SSS aumentou a viabilidade do *L. casei* B-442 em 1 log na fase duodenal e 4 ciclos log na jejunal (8,59 log UFC/mL). Esse comportamento é relatado como um estado de recuperação celular que se dá logo após a fase gástrica, na qual as células probióticas estariam viáveis e não cultiváveis, começando a recuperação dos danos celulares em melhores condições de pH na fase duodenal e jejunal, voltando a ser cultivável (COSTA *et al.*, 2017; RODRIGUES *et al.*, 2019). Trabalhos anteriores com BAL demonstraram essa recuperação das células após condições de estresse onde mecanismos de reparação são ativados como produção de exopolissacarídeos, homeostases do pH intracelular e reparação das estruturas danificadas (COSTA *et al.*, 2017; RIBEIRO *et al.*, 2020; SOARES *et al.*, 2019). A adição

do prebiótico também favorece essa recuperação das células probióticas em condições gastrointestinais. Queijo tipo *cottage* revestidos com simbiótico *L. plantarum* CECT 9567 e ácido lactobiônico (prebiótico) promoveu uma maior sobrevivência principalmente nas fases entérica protegendo contra a ação de sais biliares e enzimas digestivas (SÁEZ-ORVIZ *et al.*, 2020).

Os resultados do suco sapota-do-Solimões adicionado de *L. casei* B-442 não fermentado (SSNF) são notórios em comparação com as outras matrizes. Diferente das outras matrizes as células probióticas não foram expostas a pH ácido antes da digestão *in vitro*, pois o SSNF tinha pH 6. Na fase gástrica o probiótico do SSNF manteve 9 log UFC/mL demonstrando maior resistência às condições ácidas. Os componentes do suco, como fibras, carotenoides e açúcares, pode ter protegido a membrana celular contra a variação do pH devido à capacidade tamponante (BERTO *et al.*, 2015b; WANG; XIE; SUN, 2020). Além disso, minerais como Mn, presente na polpa de sapota-do-Solimões (0,40 mg/100g), aumenta a tolerância das cepas de BAL ao estresse oxidativo (BERTO *et al.*, 2015b; RICCIARDI *et al.*, 2015; ZHANG *et al.*, 2020). Houve uma diminuição significativa ($p \leq 0,05$) entre as fases duodenal pH 5 e jejunal pH 7 de 1 log UFC/mL, porém aproximadamente 6 log UFC/mL resistiu as condições gastrointestinais.

Um alimento probiótico deve ter no mínimo 6 log UFC/mL no momento do consumo, mas recomenda-se 9 log UFC/mL para garantir a sobrevivência até chegar ao epitélio intestinal e exercer benefícios à saúde (SWANSON *et al.*, 2020; VALERO-CASES *et al.*, 2020). Os resultados obtidos para os sucos funcionais de sapota-do-Solimões são promissores, pois as contagens obtidas de 3,67 a 8,59 log UFC/mL após digestão simulada *in vitro* se aproximam de testes *in vivo*. Como foi relatado em estudo com *L. casei* DG[®] (*Lactobacillus paracasei* CNCMI1572) que sobreviveu ao trânsito gastrointestinal quando ingerido numa dose de 9 log UFC/mL por crianças obtendo no máximo 4,3 log UFC/g de células viáveis em suas fezes (RADICIONI *et al.*, 2019).

5.3 Sobrevivência do *L. casei* B-442 nos sucos funcionais de sapota-do-Solimões durante armazenamento a frio (4 °C)

Durante a fermentação as BAL produzem diferentes ácidos orgânicos e compostos bioativos com poder antimicrobiano como peróxido de hidrogênio, diacetil,

bacteriocinas, peptídeos e compostos fenólicos podendo promover uma melhor sobrevivência das células probióticas durante o armazenamento (MUHIALDIN; KADUM; MEOR HUSSIN, 2021). O pH não mudou para o SSP após o armazenamento mantendo-se em 3,46, mas para o SSS houve uma leve diminuição no pH de 3,45 para 3,38, sugerindo pós-acidificação (Tabela 7). Como bactéria heterofermentativa facultativa, as cepas de *L. casei* tem o ácido láctico como metabólito principal, o que melhora sua resistência ao estresse ácido (HILL *et al.*, 2018). As bactérias do gênero *Lactobacillus* têm um mecanismo para homeostase do pH citoplasmático podendo tolerar citoplasma com pH ácido (pH interno: 4,4; pH externo: 3,5). Por outro lado, quando um certo limiar de pH citoplasmático é superado, as funções celulares são inibidas (ARNOLD *et al.*, 2018; FONTELES *et al.*, 2012).

Tabela 7- Parâmetros físico-químicos e taxa de sobrevivência do *L. casei* B-442 nos sucos funcionais de sapota-do-Solimões durante o armazenamento

	Dias	pH	°Brix	log UFC/mL	Taxa de sobrevivência %
SSP	1	3,45 ± 0,10 ^a	1,87 ± 0,06 ^b	11,06 ± 0,10 ^a	99,99 ± 0,88 ^a
	30	3,46 ± 0,10 ^a	2,10 ± 0,05 ^a	10,80 ± 0,30 ^a	94,96 ± 1,57 ^b
SSS	1	3,45 ± 0,01 ^a	10,7 ± 0,10 ^a	11,52 ± 0,07 ^a	100 ± 0,63 ^a
	30	3,38 ± 0,10 ^b	10,6 ± 0,06 ^b	9,50 ± 0,17 ^b	82,48 ± 1,51 ^b

Letras diferentes na mesma coluna e para o mesmo suco indicam diferenças estatisticamente significativas ($p \leq 0,05$). Suco de sapota-do-Solimões probiótico (SSP) e suco de sapota-do-Solimões simbiótico (SSS).
Fonte: Elaborada pela autora.

O SSS durante 30 dias de armazenamento diminuiu 2 ciclos log do *L. casei* B-442, enquanto o SSP não apresentou mudança significativa ($p \leq 0,05$) na viabilidade do *L. casei* B-442 (Tabela 7). Sucos probióticos de caju e melão fermentados por *L. casei* B-442 também mantiveram viabilidade acima de 8 log UFC/mL durante 42 dias a 4 °C (FONTELES *et al.*, 2012; PEREIRA; MACIEL; RODRIGUES, 2011). Por outro lado, o suco de abacaxi probiótico, reduziu a viabilidade do *L. casei* B-442 mantendo 6 log UFC/mL durante 42 dias de armazenamento, com a adição de sacarose esse valor foi 2 ciclos log menor (COSTA *et al.*, 2013a). Em um suco de pera simbiótico contendo *Bacillus coagulans* IBRC-M 10807 imobilizado em pectina houve a redução da viabilidade do probiótico de 9 para 6 log UFC/mL após 35 dias de armazenamento a 4 °C. No estudo de suco misto de cenoura e laranja contendo inulina e fermentado por *L. acidophilus* CECT 903, após 20 dias foi observado uma maior viabilidade do probiótico

(7,79 log UFC/mL) para o suco contendo 3% de inulina (*p/v*) (VALERO-CASES; FRUTOS, 2017).

Além disso, a pressão osmótica é outro ponto importante no SSS devido ao alto valor do °Brix acima de 10 que pode ter afetado a viabilidade do *L. casei* B-442 como é expresso pela taxa de sobrevivência de 82,48% após armazenamento. O SSS e SSP teve pequenas variações no valor do °Brix, podendo ser explicado pelo o uso de monossacarídeos pelas células probióticas, assim como hidrólise de sacarose residual. A adição do prebiótico inulina em suco misto de cenoura e laranja fermentado por *L. acidophilus* CECT 903 causou uma diminuição do valor do °Brix e na viabilidade do probiótico ao longo dos 40 dias de armazenamento (VALERO-CASES; FRUTOS, 2017).

5.4 Parâmetros de cor nos sucos funcionais de sapota-do-Solimões durante o armazenamento a frio (4 °C)

Os parâmetros de cor são apresentados na Tabela 8. Os valores de L^* foram superiores a 50 (escala preto-branco) indicando luminosidade média. O parâmetro a^* diminuiu de 10 para 6 no SSP e 7 no SSS (escala verde-vermelha) após a fermentação indicando uma predominância da cor verde, mas após o armazenamento esse valor aumentou ($p \leq 0,05$) no SSP para 9. Parâmetro b^* em torno de 50 (escala azul-amarela) indicando a cor amarela intermediária. Em geral, a cor dos sucos funcionais se tornou mais vivida e laranja devido ao incremento de L^* e h° após a fermentação. No entanto, durante o armazenamento, o SSP ficou mais escuro do que o SSS, como sugerem a redução de L^* e h° .

Tabela 8 - Parâmetros de cor dos sucos funcionais de sapota-do-Solimões durante o armazenamento a 4 °C

	Dia	L*	a*	b*	C	h°	ΔE
SSI	1	56.05 ± 0.03 ^d	10.35 ± 0.02 ^a	45.14 ± 0.06 ^a	46.31 ± 0.06 ^a	77.09 ± 0.02 ^e	-
SSP	1	61.51 ± 0.05 ^a	6.19 ± 0.03 ^c	44.57 ± 0.04 ^c	45.00 ± 0.04 ^c	82.10 ± 0.05 ^a	6.89 ± 0.05 ^a
	30	57.76 ± 0.04 ^c	9.37 ± 0.06 ^b	44.72 ± 0.07 ^b	45.69 ± 0.06 ^b	78.17 ± 0.08 ^d	2.02 ± 0,05 ^d
SSS	1	57.74 ± 0.02 ^c	7.36 ± 0.02 ^c	44.32 ± 0.02 ^d	44.93 ± 0.02 ^c	80.57 ± 0.03 ^c	3.81 ± 0.03 ^c
	30	58.49 ± 0.04 ^b	6.74 ± 0.04 ^d	42.15 ± 0.12 ^e	42.69 ± 0.12 ^d	80.91 ± 0.07 ^b	3.96 ± 0.05 ^b

Letras diferentes na mesma coluna indicam que as amostras são estatisticamente diferentes ($p \leq 0,05$). Suco de sapota-do-Solimões *in natura* (SSI), suco de sapota-do-Solimões probiótico (SSP) e suco de sapota-do-Solimões simbiótico (SSS). Fonte: Elaborada pela autora.

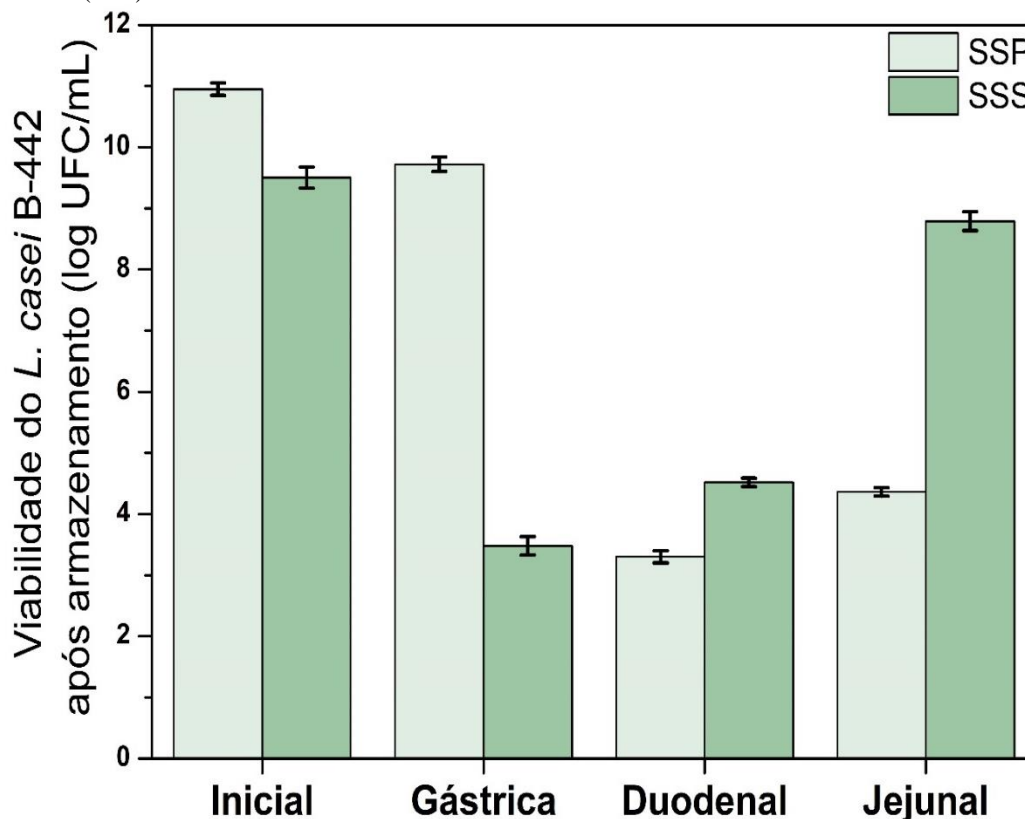
Suco de laranja fermentado por *L. casei*-01 tornou-se mais escuro e mais amarelo, observado pela redução de L^* e o incremento a^* durante o armazenamento. Isso foi relacionado a reações oxidativas e não oxidativas de polifenóis, reação de Maillard ou formação de melanoidinas (DA COSTA *et al.*, 2017). Suco de manga fermentado por três cepas (*L. bulgaricus* S1, *Streptococcus thermophilus* 6063, e *L. plantarum* Lp-115, na proporção 1:2:1) e pré-tratado por ultrassom diminuiu L^* , a^* , e b^* durante o armazenamento tornando-se mais escuro, vermelho e menos amarelo (WANG; XIE; SUN, 2020). O conteúdo de compostos bioativos em sucos de frutas (antocianina, carotenoides e fenólicos), além de ter um efeito positivo a viabilidade das células, está diretamente relacionada à cor do suco (DE OLIVEIRA *et al.*, 2020).

O parâmetro croma (C^*) está relacionado à intensidade da cor que diminuiu principalmente para o SSS após 30 dias de armazenamento. Um comportamento diferente foi mostrado pelo suco de caju fermentado por *L. casei* B-442, no qual C^* aumentou durante o armazenamento (PEREIRA *et al.*, 2013a). Isso ocorre devido à reações de oxidação, isomerização e condensação dos compostos extraídos dos vacúolos por bactérias, além do pH ácido que pode gerar mudanças na cor do suco (WANG; XIE; SUN, 2020). O tom da cor foi avaliado pelo ângulo de matiz (h°) do verde-amarelo predominou à cor amarela em torno de 80° . Suco de abacaxi fermentado por *L. casei* B-442 mostrou comportamento semelhante com ligeira variação no ângulo h° , mantendo a cor característica do suco em todo o armazenamento (COSTA *et al.*, 2013b).

5.5 Viabilidade do *L. casei* B-442 nos sucos funcionais de sapota-do-Solimões durante digestão *in vitro* após armazenamento a frio (4 °C)

Na Figura 3 são apresentados os resultados da viabilidade do *L. casei* B-442 nos sucos funcionais de sapota-do-Solimões através de digestão *in vitro* após 30 dias de armazenamento refrigerado. As células probióticas sofreram redução de 1 ciclo log no SSP após a fase gástrica. No SSS, a viabilidade do probiótico diminuiu quase 4 ciclos log após a fase gástrica. Após as fases entéricas, a viabilidade do *L. casei* B-442 aumentou em ambos os sucos. O suco probiótico recuperou 1 ciclo log após a fase jejunal, finalizando o processo de digestão com 4,36 log UFC/mL, o que é um resultado promissor para uma matriz probiótica após 30 dias de armazenamento.

Figura 3- Viabilidade do *L. casei* B-442 nos sucos funcionais de sapota-do-Solimões durante digestão *in vitro* após armazenamento. Suco de sapota-do-Solimões probiótico (SSP) e suco de sapota-do-Solimões simbiótico (SSS)



Fonte: Elaborada pela autora.

No SSS, o probiótico *L. casei* B-442 começou a recuperar sua atividade metabólica na fase duodenal atingindo 8 log UFC/mL ao final da digestão simulada. Portanto, o incremento na viabilidade do probiótico ao final da digestão simulada pode ser atribuído à capacidade da célula de se recuperar e crescer quando exposta a pH favorável (DIAS *et al.*, 2018). Conforme mostrado na Tabela 7, o processo de fermentação promoveu certa fragilidade ao microrganismo resultando em uma menor viabilidade ao longo da simulação do processo digestivo imediatamente após a fermentação. No entanto, a fermentação permite que a cepa se adapte à matriz alimentar ao longo do armazenamento aumentando sua resistência as condições digestivas como mostrado na Figura 3. Após 30 dias de armazenamento a 4 °C de uma bebida mista não fermentada de banana, morango e juçara contendo *L. casei* BGP9, houve perda de viabilidade microbiana de 3 ciclos log na fase gástrica da digestão simulada. A viabilidade celular diminuiu ao longo do armazenamento com contagens < 1 log UFC/mL após 6 h de digestão e 90 dias em condições de armazenamento (RIBEIRO *et al.*, 2020). Neste trabalho, a perda de viabilidade na fase gástrica após 30 dias de armazenamento refrigerado foi de 1 ciclo log em SSP e 4 ciclos log em SSS, mostrando que a

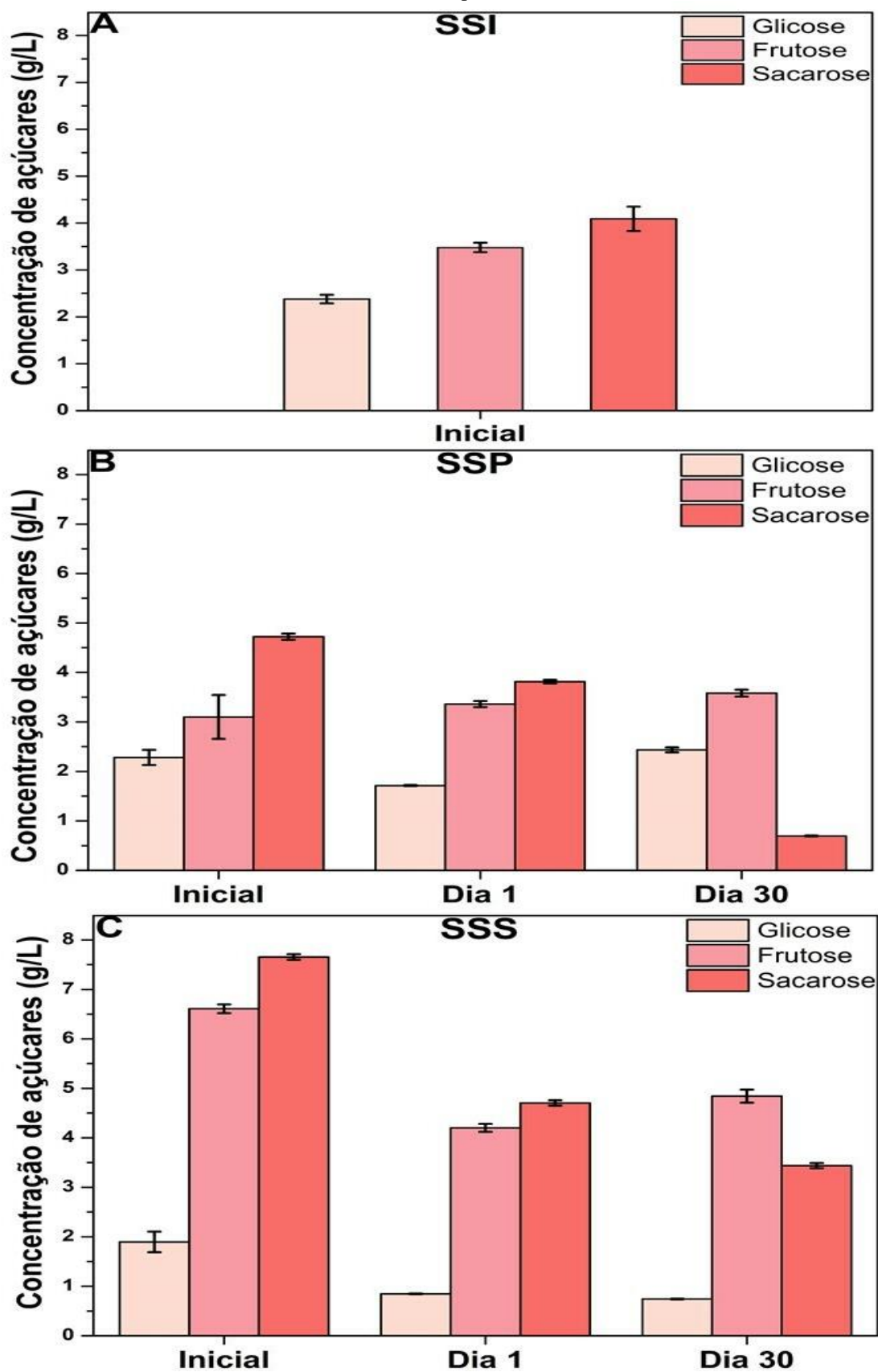
sobrevivência microbiana está relacionada à combinação da cepa, matriz e sensibilidade celular aos efeitos das condições de armazenamento. Em alguns casos, o armazenamento a frio pode melhorar a sobrevivência das células devido à expressão de genes ou resistência a múltiplos fatores de estresse (pH, nutrientes, enzimas digestivas). O armazenamento em pH ácido promove resistência a acidez, o que pode melhorar a sobrevivência celular contra outros estressores (DUDKIEWICZ *et al.*, 2020). Por exemplo, em suco de laranja após 30 dias de armazenamento, *L. paracasei* PXN 37 (8 log UFC/mL) demonstrou maior resistência ao estresse ácido no ambiente gástrico do que *L. acidophilus* La-5 (3 log UFC/mL) (SOARES *et al.*, 2019). Os mecanismos adaptativos microbianos podem ajudar as células a diminuir os danos causados pelas condições de digestão. Bomba de prótons e chaperonas podem reparar proteínas danificadas relacionadas à manutenção celular (ARNOLD *et al.*, 2018; RODRIGUES *et al.*, 2019). Nas fases entéricas, a viabilidade das células de probiótico é afetada pela presença de ácidos biliares, que podem romper a membrana devido à sua característica anfifílica, levando à lise e morte celular (CHEN *et al.*, 2012). Portanto, a presença de gordura na matriz probiótica pode proteger a membrana celular, pois estas atuam como emulsificantes, evitando a ação da bile na membrana celular do probiótico (DUDKIEWICZ *et al.*, 2020).

O aumento da viabilidade celular após a fase entérica simulada foi relatado anteriormente para *L. rhamnosus* GG em sorvete de açaí (alto teor de gordura), que apresentou um grande incremento na sobrevivência celular na fase jejunal (>4 log UFC/g) comparando com a duodenal (<1 log UFC/g) após 28 dias de armazenamento sob refrigeração. Essa recuperação celular enfatiza o efeito protetor da gordura contra os sais biliares e a recuperação da viabilidade celular. A capacidade de recuperação de *Lactobacillus* ao longo da digestão depende da cepa e da matriz probiótica (COSTA *et al.*, 2017). Além disso, a adição de prebióticos pode aumentar a proteção contra as condições adversas do processo digestivo. A inulina, por exemplo, forma uma rede de gel de partículas com água que protege as células contra o pH ácido, permitindo sua recuperação e diminuindo a ação de enzimas digestiva (SOUZA; GIOIELLI; SAAD, 2017).

5.6 Concentração dos açúcares nos sucos funcionais de sapota-do-Solimões durante o armazenamento a frio (4 °C)

Sucos de frutas são fontes de diferentes nutrientes como aminoácidos, minerais, vitaminas e principalmente açúcares, que destacam sua capacidade como matriz para probióticos. Na Figura 4, são apresentados a variação da concentração de glicose, frutose e sacarose para o SSI (Figura 4A), SSP (Figura 4B) e SSS (Figura 4C) antes e depois do armazenamento a 4 °C. O SSI contém menos glicose (2,38 g/L) que frutose (3,48 g/L) e sacarose (4,09 g/L). Esse resultado já foi demonstrado anteriormente na avaliação da polpa de sapota-do-Solimões em diferentes estados de maturação, na qual uma maior concentração de açúcares não-redutores (sacarose) do que redutores (glicose e frutose) foi reportado (MONTEIRO *et al.*, 2018c).

Figura 4- Concentração de açúcares dos sucos funcionais de sapota-do-Solimões durante os 30 dias de armazenamento (4 °C). Suco de sapota-do-Solimões *in natura* (A), suco de sapota-do-Solimões probiótico-SSP (B) e suco de sapota-do-Solimões simbiótico-SSS (C)



Fonte: Elaborada pela autora.

No SSP a cepa de *L. casei* B-442 usou preferencialmente glicose (1,71 g/L) e sacarose (3,81 g/L) em vez de frutose (3,35 g/L) como fontes de carbono. *L. casei* B-442 quando usado na fermentação do suco de caju, a frutose (34,53%) foi mais consumida do que a sacarose (30,75%) ou glicose (30,75%) (PEREIRA *et al.*, 2013a). No suco de cacau (*Theobroma cacao* L.) essa cepa consumiu somente glicose (SANTOS FILHO *et al.*, 2019). Enquanto, a frutose foi o principal substrato no suco de cupuaçu (*Theobroma grandiflorum*) (PEREIRA *et al.*, 2017b). O consumo preferencial de uma fonte de carbono do que outra é denominado repressão catabólica de carbono (WANG, YUCHEN, *et al.*, 2019). Além disso, os estudos acima sugerem que o consumo de açúcar depende não só da cepa, mas também dos parâmetros de fermentação e da matriz.

O SSS possui maior quantidade de mono e dissacarídeos devido a adição do FOS (P95, BENEIO-ORAFIT) que contém aproximadamente 6g/100g desses açúcares simples (ALMEIDA *et al.*, 2017). Glicose (0,84 g/L), frutose (4,20 g/L) e sacarose (4,70 g/L) foram consumidas durante a fermentação. *L. casei* B-442 consumiu glicose e frutose em suco de caju integral, e mesmo após a adição de oligossacarídeos e dextrana essa cepa foi capaz de consumir todos os açúcares simultaneamente (LEITE *et al.*, 2021a). Em néctares com baixa concentração de açúcar o prebiótico inulina foi utilizado pelas cepas de BAL (VALERO-CASES; FRUTOS, 2017). O mesmo foi observado em bebida fermentada simbiótica de milho e arroz adicionada com FOS, na qual a ausência de prebióticos estimulou as diferentes cepas de BAL a consumir frutose, glicose e maltose, enquanto com o prebiótico esse consumo foi menor (FREIRE; RAMOS; SCHWAN, 2017). Por outro lado, consumo de sacarose por BAL também pode sugerir a produção de FOS por meio das enzimas frutansacarases e invertases. Por exemplo, cinco cepas probióticas *L. acidophilus* TISTR 1338, *L. casei* TISTR 390, *L. plantarum* TISTR 543, *B. longum* TISTR 2195 e *Leuconostoc mesenteroides* TTISTR 053 mostraram diferentes rendimentos na produção de FOS em suco de caju obtendo altos rendimentos de nistose (FOS GF3) com 24h de fermentação (KAPRASOB *et al.*, 2018).

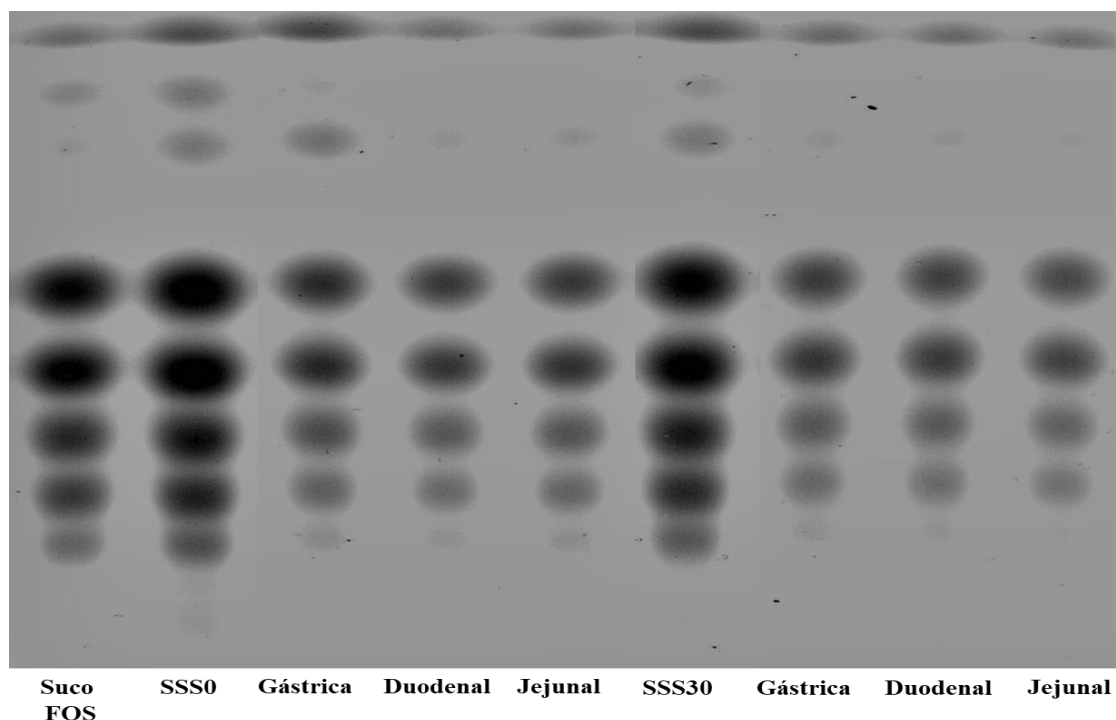
SSP e SSS apresentaram consumo de açúcares diferente durante o armazenamento. Enquanto no SSP após 30 dias houve consumo de sacarose (0,69 g/L) e aumento da concentração de glicose (2,43 g/L) e frutose (3,58 g/L). SSS após 30 dias houve o consumo de sacarose (3,43 g/L) e aumento de frutose (4,84 g/L). Durante o armazenamento as BAL podem ativar alguns mecanismos de defesas como a produção

de exopolissacarídeos em resposta às condições de estresse. Assim, as glicosiltransferases presentes nas cepas de BAL poderiam produzir polissacarídeos de cadeia longa liberando frações de frutose (CASTRO-BRAVO *et al.*, 2018). No suco misto de morango, banana e juçara adicionados com *L. casei* BGP93 foi observado variação da concentração de frutose e glicose que foi relacionado ao consumo para metabolismo dos microrganismos (RIBEIRO *et al.*, 2020).

5.7 Concentração dos frutooligossacarídeos durante digestão *in vitro* do suco simbiótico de sapota-do-Solimões durante o armazenamento a frio (4 °C)

A maioria dos estudos recentes com FOS como um produto simbiótico não avaliou o comportamento durante a digestão *in vitro*, apenas o efeito sobre a viabilidade celular. Uma vez que a capacidade dos prebióticos de alcançar o intestino para ser usado como substrato para microrganismos autóctones determina sua função, avaliar a integridade dos FOS é de suma importância. Na Figura 5, são apresentados os 7 GP de FOS no SSS. Os FOS mantiveram a integridade dos GP mesmo durante o armazenamento. Enquanto, durante a digestão simulada GP 7 apresentou uma faixa mais curta na fase jejunal após o armazenamento.

Figura 5 - Frutooligossacarídeos do suco simbiótico de sapota-do-Solimões durante digestão *in vitro* e antes e após armazenamento (4 °C). Suco de sapota-do-Solimões probiótico (SSP) e suco de sapota-do-Solimões simbiótico (SSS)



Fonte: Elaborada pela autora.

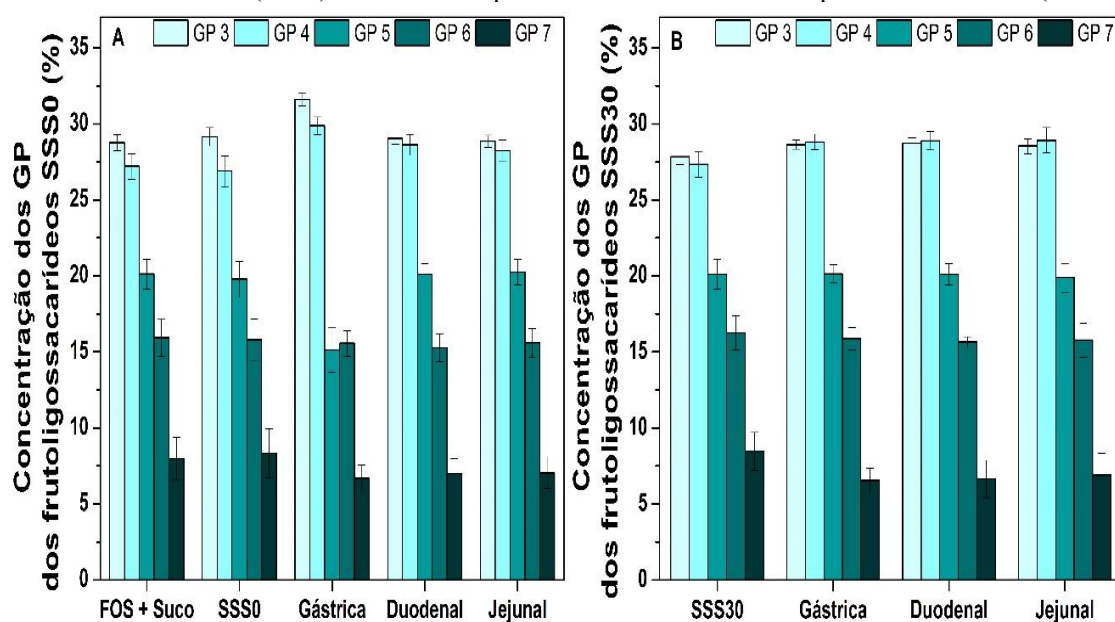
Espécies do gênero *Lacticaseibacillus* podem metabolizar FOS, sendo 1-kestose e nistose preferencialmente metabolizadas (KAPLAN; HUTKINS, 2003). Algumas cepas de *L. casei* podem crescer usando FOS como fonte de carbono, no entanto, Silva *et al.*, (2017), mostraram que *L. casei* (LC-1) teve maior crescimento usando apenas glicose (8 log UFC/mL) como fonte de carbono do que FOS (7 log CFU/mL). Por outro lado, outras cepas como *L. paracasei* ATCC 27092 e *L. plantarum* ATCC 14917 cresceram igualmente para ambas as fontes de carbono. Uma vez que o suco sapota-do-Solimões tem glicose, frutose e sacarose, é provável que *L. casei* B-442 tenha usado esses açúcares como fontes de carbono.

O tamanho do substrato também é importante para a preferência do metabolismo das BAL, assim, substratos com menor peso molecular, o consumo de FOS pode ser menor ou não consumido. Além disso, a taxa de consumo também é afetada, como mostra Figueroa-González *et al.*, (2019). Em um meio contendo uma fonte de carbono, *L. casei* Shirota apresentou maior taxa de consumo de lactose do que FOS, por outro lado, *L. johnsonii* teve o maior consumo para FOS. Apesar das diferentes taxas de consumo, os autores sugeriram que o metabolismo de FOS por cepas de *L. casei* é feito

pela absorção através do sistema de transporte de ligação dependente de ATP e hidrólise por uma β -frutosidase citoplasmática (KAPLAN; HUTKINS, 2003).

A análise de densitometria permitiu a quantificação da concentração relativa dos GP dos FOS a partir das placas de TLC. Assim, na Figura 6 os resultados foram expressos como a concentração relativa de cada GP na amostra. Figura 6A é mostrado os resultados do SSS0, no geral, a proporção de cada GP não mudou, comparando com o suco antes ou depois da fermentação. Na fase gástrica, observou-se possível hidrólise da GP 5 em GP 3 e GP 4. No entanto, na fase entérica, a DP 5 aumentou, e DP 3 e 4 diminuíram para a quantidade antes da digestão. Após 30 dias em armazenamento a frio a concentração de FOS não mudou, nem mesmo junto com as fases de digestão.

Figura 6 - Concentração relativa dos graus de polimerização dos frutooligossacarídeos do suco simbiótico de sapota-do-Solimões durante digestão *in vitro* e antes e após armazenamento (4 °C). A- Suco de sapota-do-Solimões simbiótico (SSS0) e B- suco de sapota-do-Solimões simbiótico após armazenamento (SSS30)



Fonte: Elaborada pela autora.

A presença de ligações $\beta(2-1)$ na estrutura do FOS aumenta a resistência à degradação intestinal, uma vez que as enzimas digestivas não podem quebrá-las. Além disso, o GP e a origem dos FOS também pode afetar a resistência dos FOS às condições de digestão. Foi demonstrado que o maior GP e os FOS comercial (Raftilose P95) foram mais resistentes à hidrólise em condições de digestão. Além disso, fruto-furanosilnístose (GP 5) não foi hidrolisado, enquanto o kestose (GP 3) foi ligeiramente hidrolisado na fase

gástrica devido ao pH baixo, e nistose (GP 4) na fase entérica por enzimas digestivas (NOBRE *et al.*, 2018). Por outro lado, quando FOS (Beneo Orafti 95P) comercial diluído em água foi utilizado por Figueiredo *et al.*, (2020), apresentaram um comportamento diferente. O teor de nistose (11%) diminuiu durante a fase gástrica, enquanto que o de kestose (10%) foi hidrolisado na fase entérica, mostrando suscetibilidade a ambientes ácidos e enzimas digestivas, respectivamente.

Raftilose P95 durante a digestão com extrato de intestino delgado de rato apresentou um comportamento de degradação da nistose ao longo de 180 minutos de exposição. A hidrólise de compostos maiores aumentou o teor de frutose (GALLEGO-LOBILLO *et al.*, 2020). Resultado semelhante foi demonstrado por Ferreira-Lazarte *et al.*, (2017), utilizando extrato de intestino delgado de rato a nistose foi parcialmente hidrolisada em kestose, aumentando o teor de frutose. Os autores sugeriram que a ligação β -(2-1) quando está unindo monômeros de frutose são mais instáveis do que quando ligam frutose e glicose como no FOS tipo inulina.

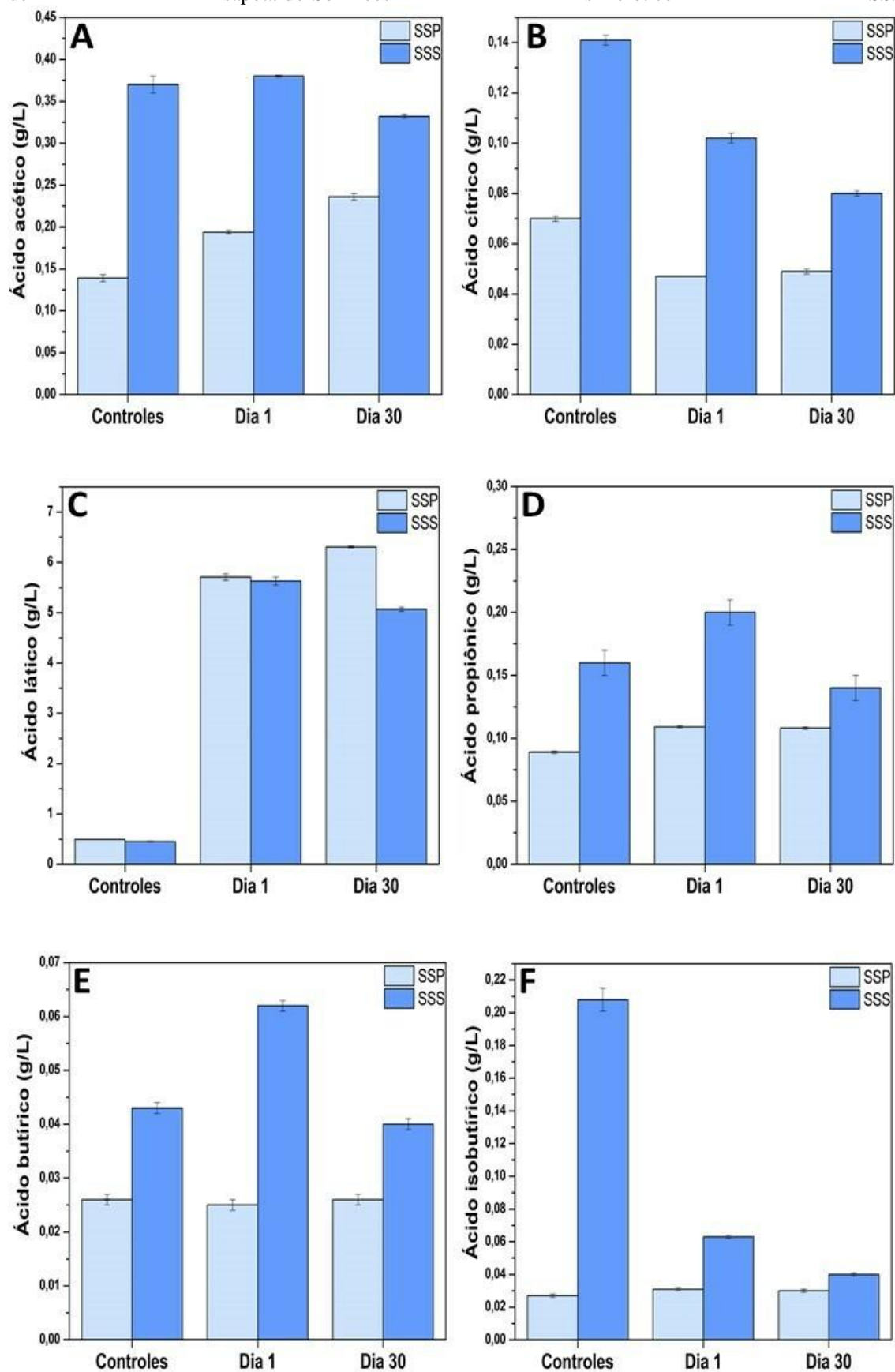
5.8 Concentração de ácidos orgânicos dos sucos funcionais de sapota-do-Solimões durante armazenamento a frio (4 °C)

Após a fermentação por BAL o ácido láctico é o principal metabólito responsável pela acidez dos alimentos fermentados. No entanto, outros ácidos como acético, cítrico, butírico, isobutírico e propiônico também são resultados desse metabolismo. Na Figura 7 é apresentada a variação desses ácidos após a fermentação e armazenamento por 30 dias.

No SSP ácido láctico e acético aumentaram a concentração após fermentação (Figura 7A e 7C). O SSS aumentou apenas o ácido láctico, enquanto o acético não mudou. Porém os dois sucos funcionais diminuíram a concentração de ácido cítrico após fermentação (Figura 7B). As cepas de probióticos podem produzir ácidos orgânicos a partir de açúcares, catabolismo de aminoácidos e ácido cítrico (MIRANDA *et al.*, 2019). O ácido cítrico é convertido em ácido láctico, ácido acético e diacetil (WANG *et al.*, 2019). No entanto, seu consumo depende da cepa e da matriz, podendo manter, diminuir ou até mesmo aumentar sua concentração (SANTOS FILHO *et al.*, 2019). O ácido cítrico presente no suco de cupuaçu (*Theobroma grandiflorum*) foi utilizado para o crescimento

do *L. casei* B-442, melhorando o valor nutricional do suco (PEREIRA *et al.*, 2017a). Na polpa de pitaia vermelha (*Hylocereus polyrhizus*), o ácido cítrico não foi consumido durante a fermentação por *L. acidophilus* LA-05 e *B. lactis* BB-12 (MORAIS *et al.*, 2019). Em outro estudo com *smoothies* de manga fermentados por *L. acidophilus* LA-3, o ácido cítrico foi usado como fonte de carbono durante o armazenamento (LUCIANO *et al.*, 2018). Neste estudo, apenas SSS diminuiu a concentração de ácido cítrico durante o armazenamento.

Figura 7- Concentração de ácidos orgânicos e ácidos graxos de cadeia curta dos sucos funcionais de sapota-do-Solimões durante 30 dias de armazenamento (4 °C). Suco de sapota-do-Solimões probiótico SSP e suco de sapota-do-Solimões simbiótico SSS



Fonte: Elaborada pela autora.

Após 30 dias de armazenamento, os ácidos acético e lático diminuíram a concentração para o SSS e aumentaram para SSP. Durante o armazenamento foi observado o aumento de ácido acético e lático dos sucos de cereja cornalina (*Cornus mas* L.) e suco misto de cenoura e laranja contendo prebióticos, farelo de trigo e inulina, respectivamente (MANTZOURANI *et al.*, 2019; VALERO-CASES; FRUTOS, 2017). O aumento do ácido acético pode ser explicado pela ativação da rota da acetato-quinase da via fosfogliconato por cepas de *L. casei*. Como a cepa de *L. casei* 37 aumentou mais de 160% do ácido acético no suco de jujuba (*Ziziphus Jujuba cv. Hetian*) (LI *et al.*, 2021). Por outro lado, o ácido lático também pode ser convertido equimolarmente em ácido acético, 1,2-propano-1,2-diol, e uma menor quantidade de etanol como foi demonstrado em suco de romã (*Punica granatum*) fermentado por *L. casei* B-1922 (MUSTAFA *et al.*, 2020). Além disso a via para produção de ácido lático pode mudar dependendo das condições de acidez da matriz alimentar. Por exemplo, *L. plantarum* SI-1 produziu 50% mais ácido lático do que *L. pentosus* MU-1 durante a fermentação do suco da fruta cítrica *hyuganatsu* (*Citrus tamurana*) que foi explicado pelo menor pH dessa, que inibiu a fermentação malolática (YUASA *et al.*, 2020).

No cólon humano, \cong 95% dos AGCC são ácido acético, ácido propiônico e ácido butírico (razão molar 3:1:1) (MARKOWIAK-KOPEĆ; ŚLIŻEWSKA, 2020). Esses ácidos são produzidos por cepas probióticas sendo responsáveis por alguns dos benefícios a saúde através da ingestão de probióticos. O ácido propiônico foi o com maior concentração nos sucos SSP e SSS, mas o butírico e o isobutírico também foram detectados em menores concentrações (Figura 7D, 7E e 7F). O ácido acético e propiônico foram relacionados como compostos voláteis responsáveis pelo sabor da polpa sapotado-Solimões (MONTEIRO *et al.*, 2018c). O SSS apresentou as maiores concentrações de AGCC após fermentação, no entanto a concentração desses compostos diminuiu após 30 dias de armazenamento.

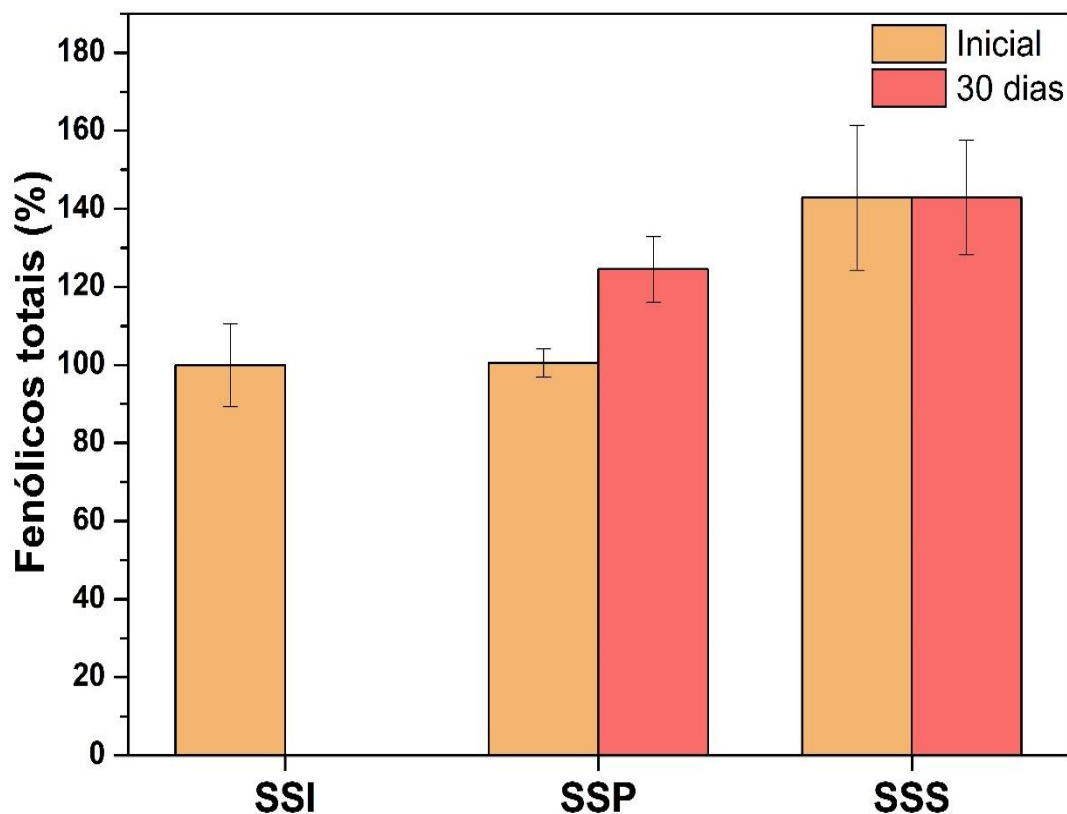
AGCC podem ser consumidos por cepas de BAL como foi demonstrado em bebida simbiótica mista de milho e arroz que após a fermentação o ácido propiônico não foi detectado. Além disso, a adição de FOS pode influenciar a produção desses ácidos uma vez que ácido isobutírico só foi detectado em amostras sem FOS (FREIRE; RAMOS; SCHWAN, 2017). A presença de prebióticos como FOS, permite quantidades suficientes

de AGCC no cólon promovendo benefícios a saúde, pois são metabólitos bioativos com poder de modular a microbiota intestinal (MARKOWIAK-KOPEĆ; ŚLIŻEWSKA, 2020; ODDI *et al.*, 2020). Além disso, o ácido butírico desempenha um papel fundamental na modulação da resposta inflamatória (MARKOWIAK-KOPEĆ; ŚLIŻEWSKA, 2020). O ácido propiônico pode inibir a conversão de acetato em colesterol e gordura. Enquanto, o ácido isobutírico (ácido graxo de cadeia ramificada) também pode ser usado como combustível para células do colón com baixa concentração de ácido butírico (OLIPHANT; ALLEN-VERCOE, 2019).

5.9 Concentração dos fenólicos totais nos sucos funcionais de sapota-do-Solimões durante armazenamento a frio (4 °C)

A concentração dos compostos fenólicos nos sucos funcionais de sapota-do-Solimões é mostrada na Figura 8. O SSP aumentou a concentração dos compostos fenólicos após 30 dias de armazenamento para 120% em relação ao SSI. Enquanto, o SSS aumentou a concentração após a fermentação por *L. casei* B-442 para 140%, não mudando após o armazenamento. O incremento de compostos fenólicos após a fermentação é esperado como demonstrado por *L. plantarum* 85 em suco de jujuba (*Ziziphus Jujuba cv. Hetian*) (LI *et al.*, 2021), *L. casei* B-442 em suco de cacau (*Theobroma cacao L.*) (SANTOS FILHO *et al.*, 2019), e *L. paracasei* K5 em suco de romã (*Punica granatum*) (MANTZOURANI *et al.*, 2020). Durante a fermentação por BAL, enzimas como β -glicosidases, podem hidrolisar os compostos fenólicos complexos para compostos mais simples aumentando a concentração dos compostos totais (MANTZOURANI *et al.*, 2020). Também pode haver a produção de compostos fenólicos pelas células vegetais ao reparar danos físico-químicos durante o armazenamento (WANG; XIE; SUN, 2020).

Figura 8 - Concentração relativa dos fenólicos totais nos sucos funcionais de sapota-do-Solimões durante armazenamento (4 °C). Suco de sapota-do-Solimões *in natura* (SSI), Suco de sapota-do-Solimões probiótico (SSP) e suco de sapota-do-Solimões simbiótico (SSS)



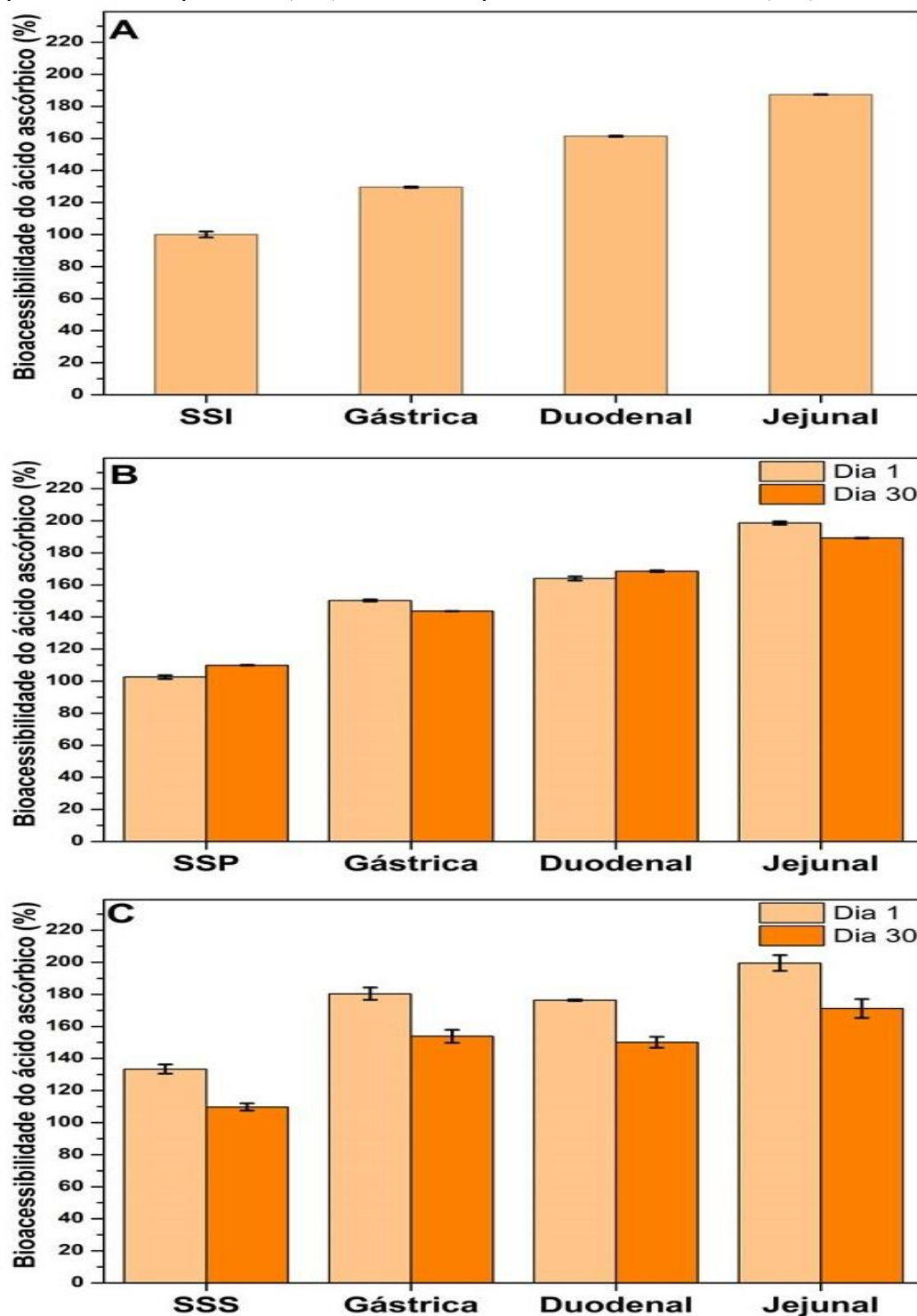
Fonte: Elaborada pela autora.

Os compostos fenólicos presentes no suco de sapota-do-Solimões podem influenciar positivamente na viabilidade e sobrevivência das células probióticas, apresentando atividade protetora ou antimicrobiana (DE OLIVEIRA *et al.*, 2020; SANTOS FILHO *et al.*, 2019). Além disso, os compostos fenólicos podem ter um efeito prebiótico estimulando a viabilidade e sobrevivência das BAL (VALERO-CASES; NUNCIO-JÁUREGUI; FRUTOS, 2017). Várias espécies de BAL são capazes de metabolizar ácidos fenólicos como demonstrado por *L. acidophilus* LA-05 e *B. lactis* BB-12 em polpa de pitaia vermelha (*Hylocereus polyrhizus*) (MORAIS *et al.*, 2019), *L. plantarum* LS5 em suco de limão adoçado (HASHEMI *et al.*, 2017) e *L. fermentum* 21828 em suco de maçã (WANG *et al.*, 2021b).

5.10 Bioacessibilidade do ácido ascórbico nos sucos funcionais de sapota-do-Solimões durante digestão *in vitro* e armazenamento a frio (4 °C)

A bioacessibilidade (compostos bioativos ingeridos disponíveis para absorção no intestino delgado após a digestão) de ácido ascórbico nos sucos funcionais de sapota-do-Solimões foi avaliada antes e depois do armazenamento a 4 °C, como mostrado na Figura 9. Ácido ascórbico ou vitamina C é um antioxidante solúvel em água que melhora o sistema imunológico, podendo ser usado como um agente redutor, o que aumenta o número de células durante o crescimento e mantém sua viabilidade durante o armazenamento (SOTO *et al.*, 2019). Após a fermentação, apenas SSS (Figura 9C) aumentou a bioacessibilidade do ácido ascórbico para 130%. Em um estudo com duas variedades de laranjas, *L. brevis* DSM32386 manteve uma quantidade maior de ácido ascórbico do que outras cepas BAL. No entanto, com o suco de laranja *Washington navel* o *L. brevis* DSM32386 diminuiu o teor de ácido ascórbico, enquanto, na variedade *Tarocco* aumentou quase 50%. O pH ácido geralmente inibe a auto oxidação do ácido ascórbico pois o potencial redox varia, porém como pH dos sucos eram iguais, esses diferentes comportamentos foram relacionados à matriz (MULTARI *et al.*, 2020). Além disso, as cepas probióticas de *Lactobacillus* (*L. casei* L-26, *L. fermentum* 56, *L. paracasei* 106 e *L. plantarum* 53), diminuíram o teor de ácido ascórbico no subproduto industrial acerola e aumentaram na goiaba durante a fermentação. Sendo relacionado à preservação contra o processo oxidativo na goiaba, enquanto na acerola provavelmente devido à atividade da ascorbato oxidase produzida pelas cepas probióticas (DE OLIVEIRA *et al.*, 2020). No suco de caju após 12 h de fermentação, o teor de ácido ascórbico aumentou 11% fermentado por *L. casei* TISTR 390 e *L. plantarum* TISTR 543, enquanto com *L. acidophilus* TISTR 1338 apenas 7%, esses valores diferentes foram atribuídos à síntese de ácido ascórbico por cepas LAB (KAPRASOB *et al.*, 2017).

Figura 9- Bioacessibilidade do ácido ascórbico nos sucos funcionais de sapota-do-Solimões durante digestão *in vitro* e armazenamento (4 °C). A- Suco de sapota-do-Solimões *in natura* (SSI), B- Suco de sapota-do-Solimões probiótico (SSP) e C suco de sapota-do-Solimões simbiótico (SSS)



Fonte: Elaborada pela autora.

No SSI (Figura 9A) a bioacessibilidade do ácido ascórbico aumentou gradualmente ao longo das fases de digestão *in vitro* alcançando 180% na fase jejunal. SSP (Figura 9B) e SSS (Figura 9C) também aumentaram a bioacessibilidade do ácido ascórbico alcançando 200% na fase jejunal. Este é um resultado notável porque o ácido ascórbico é absorvido em todo o epitélio do intestino delgado, principalmente no íleo e jejuno via transporte ativo de sódio (THAKUR *et al.*, 2020). Assim, maiores quantidades de ácido ascórbico em fases entéricas favorecem os benefícios para a saúde, como a redução do risco de câncer e doenças cardiovasculares (RODRÍGUEZ-ROQUE *et al.*, 2015).

Após o período de armazenamento o SSP aumentou a bioacessibilidade de ácido ascórbico enquanto SSS diminuiu. Isso pode estar relacionado a instabilidade desse composto principalmente em condições de armazenamento sendo degradado devido à presença de luz, altas temperaturas e pH baixo, além disso, a formação de pigmentos escuros devido à oxidação aeróbica compromete a escolha do consumidor (MIRANDA *et al.*, 2019; MONTEIRO *et al.*, 2018b). Outro fator é a formação de agregados devido à produção de polissacarídeos pelas BAL, durante o armazenamento, tornando o suco mais viscoso e as moléculas de ácido ascórbico menos acessíveis (CILLA *et al.*, 2018). A sapota-do-Solimões possui um conteúdo significativo de pectina que também pode aumentar a viscosidade do suco na presença de ácido e sacarose, podendo ainda ser usada como prebiótico pela microbiota do hospedeiro (CARVALHO *et al.*, 2014).

Por outro lado, o aumento da bioacessibilidade pode ser atribuído à extração de compostos bioativos a partir dos vacúolos das células, isomerização e reações de condensação pelo metabolismo das BAL (DE OLIVEIRA *et al.*, 2020; WANG; XIE; SUN, 2020). Suco de limão adoçado fermentado com *Lactobacillus plantarum* LS5 diminuiu drasticamente o teor de ácido ascórbico durante o armazenamento (30 dias), mas apresentou maior teor de ácido ascórbico que o suco *in natura*, mostrando que a fermentação com a cepa probiótica favoreceu a preservação do ácido ascórbico durante o armazenamento (HASHEMI *et al.*, 2017). Em contrapartida, o ácido ascórbico pode ter um efeito protetor as BAL durante o armazenamento, devido à capacidade de capturar oxigênio criando um ambiente anaeróbico, uma vez que as cepas geralmente são aeróbicas ou microaerofílicas, diminuindo a toxicidade gerada pelo oxigênio (OLIVARES *et al.*, 2019). Suco de manga fermentado por três cepas diferentes

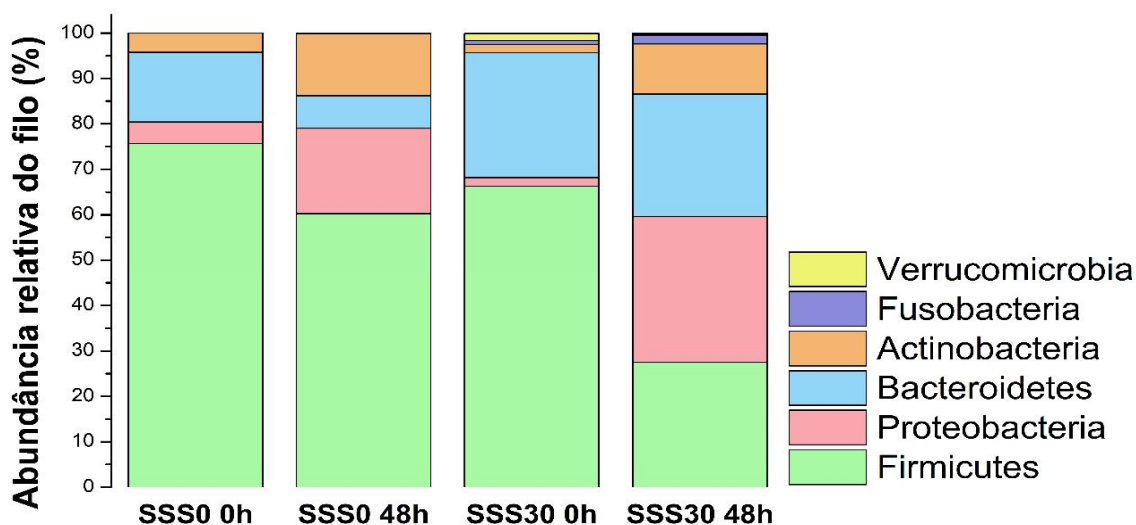
(*Lactobacillus bulgaricus* S1, *Streptococcus thermophilus* 6063, e *Lactobacillus plantarum* Lp-115) teve 14% de bioacessibilidade do ácido ascórbico e após 30 dias de armazenamento diminuiu para 6% (WANG; XIE; SUN, 2020).

A polpa de sapota-do-Solimões (°Brix 12) apresenta 10,93 mg/100g de ácido ascórbico (MONTEIRO *et al.*, 2018b). Portanto, os sucos funcionais de sapota-do-Solimões tem mais de 40% (ingestão de 200 mL) do valor alimentar recomendado, que é de 90 mg/dia para homens de adultos e 75 mg/dia para mulheres (DA COSTA *et al.*, 2017).

5.11 Caracterização da microbiota intestinal após fermentação colônica do suco simbiótico de sapota-do-Solimões antes e após armazenamento a frio (4 °C)

Diante dos resultados obtidos o suco simbiótico de sapota-do-Solimões, SSS0 antes e após armazenamento sob refrigeração SSS30, foram fermentados por microbiotas colônicas para avaliar o efeito do suco simbiótico sobre a microbiota intestinal. Para esse estudo foram utilizados o suco recém fermentado (SSS0) e o suco após 30 dias de armazenamento a 4 °C (SSS30). A fermentação ocorreu em reator de bancada com capacidade de 1 L. A contagem de *L. casei* B-442 na fase duodenal foi de 7,55 log UFC/mL para SSS0 e 5,76 log UFC/mL para SSS30. Demonstrando que o período de armazenamento pode ter aumentado o estresse as células probióticas diminuindo a viabilidade ao longo do tempo. A abundância relativa dos filos de bactérias encontrados antes e após a fermentação colônica são apresentados na Figura 10.

Figura 10 – Abundância relativa dos filos identificados durante a fermentação colônica do suco simbiótico de sapota-do-Solimões antes e após armazenamento a 4 °C. Suco de sapota-do-Solimões simbiótico (SSS0) e suco de sapota-do-Solimões simbiótico após 30 dias de armazenamento (SSS30)

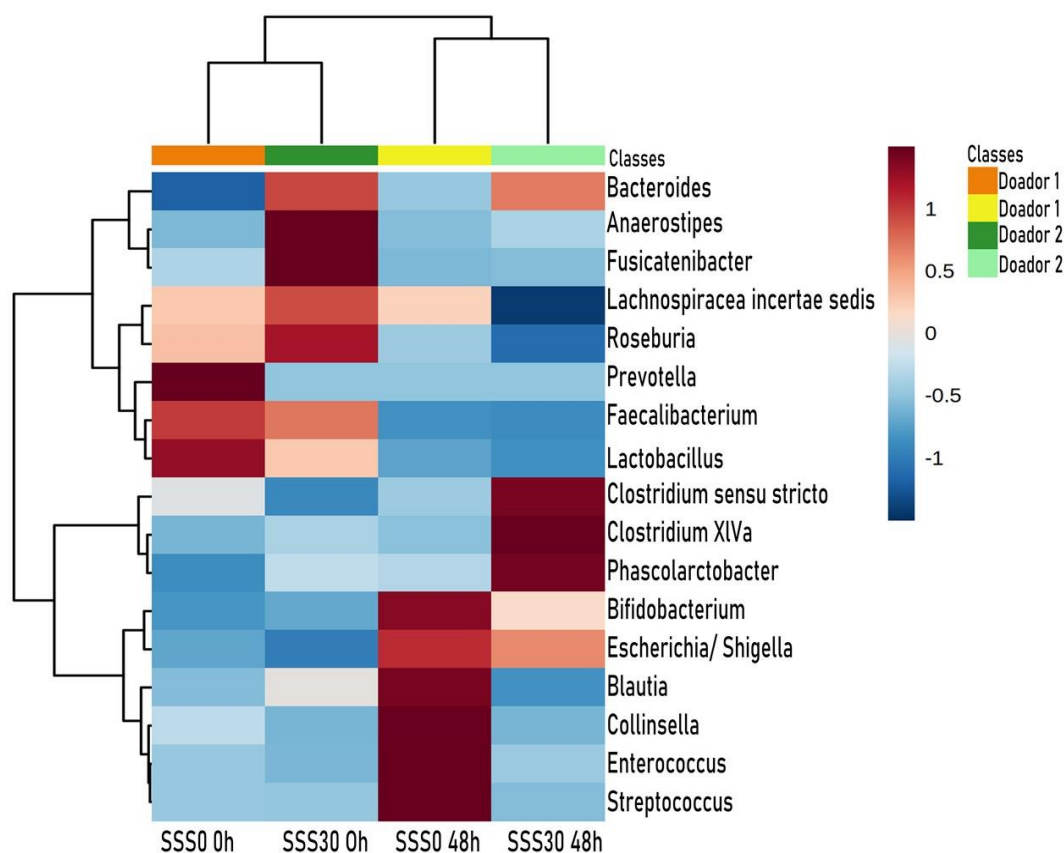


Fonte: Elaborada pela autora.

Firmicutes, Proteobacteria, Bacteroidetes e Actinobacteria foram os filos mais prevalentes após a fermentação colônica do SSS antes e após armazenamento. Foi demonstrado o incremento de Actinobacteria seguido por decréscimo de Firmicutes após a fermentação colônica. Resultado semelhante foi previamente demonstrado na microbiota fecal de camundongos alimentados com FOS (5%) (MAO *et al.*, 2018). Em contrapartida, em um estudo *in vivo* com camundongos alimentados com FOS (16g/dia) Actinobacteria e Verrucomicrobia aumentaram a abundância, enquanto Proteobacteria e Firmicutes não mudaram (LIU *et al.*, 2017).

No *heatmap* apresentado na Figura 11 os gêneros são representados de acordo com a abundância na amostra e as amostras representadas rearranjadas de acordo com suas similaridades. A cor vermelha mais escura representa maior abundância em gênero entre as amostras, e azul escuro para menor abundância.

Figura 11- Identificação dos gêneros com maior abundância durante a fermentação colônica do suco simbiótico de sapota-do-Solimões antes e após armazenamento a 4 °C. Suco de sapota-do-Solimões simbiótico (SSS0) e suco de sapota-do-Solimões simbiótico após 30 dias de armazenamento (SSS30)



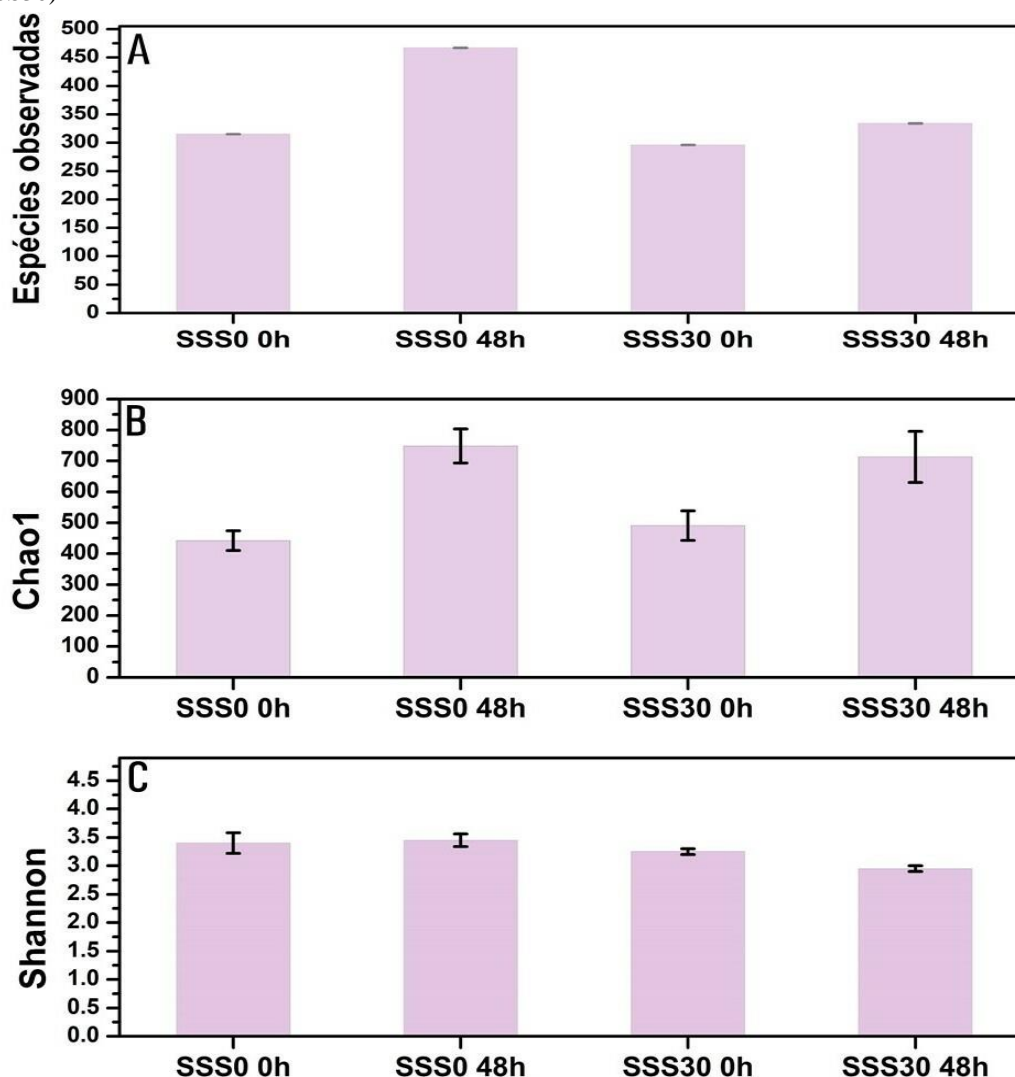
Fonte: Elaborada pela autora.

A caracterização microbiana foi mais distinta para o gênero, uma vez que 17 gêneros foram os mais prevalentes. As amostras antes da fermentação (SSS0 0h e SSS30 0h) foram completamente diferentes após 48 h de fermentação colônica (SSJ0 48h e SSJ30 48h). As semelhanças foram vistas para SSS0 0h e SSS30 0h, que apresentaram mais *Lactobacillus* do que após a fermentação colônica. Logo a maior abundância de *Lactobacillus* nas amostras iniciais e menos após a fermentação colônica, demonstra que o ambiente extremamente competitivo favoreceu os microrganismos autóctones (HENRIQUE-BANA *et al.*, 2020). Enquanto, SSS0 48h e o SSS30 48h aumentaram o gênero *Bifidobacterium*, que é um gênero que fermenta carboidratos simples e complexos, inibe o crescimento de patógenos e melhora distúrbios gastrointestinais (LEITE *et al.*, 2021a; O'CALLAGHAN; VAN SINDEREN, 2016). Além disso, os FOS estimulam o crescimento das *Bifidobacterium*, como demonstrado em diferentes estudos (LIU *et al.*, 2017; MAO *et al.*, 2018; TANDON *et al.*, 2019). Os gêneros *Faecalibacterium*, *Roseburia* e *Blautia* estão envolvidos na fermentação de carboidratos

complexos como oligossacarídeos de pectina (GUTIÉRREZ-SARMIENTO *et al.*, 2020). A polpa de sapota-do-Solimões é rica em pectina que pode ser facilmente fermentadas por bactérias intestinais com a produção de AGCC (ELSHAHED *et al.*, 2020; MACIEL DA SILVA; HENRIQUE CAMPELO; RODRIGUES, 2022). O aumento de *Collinsella* foi relatado após a suplementação com vitamina C, presente no suco de sapota-do-Solimões. Esse gênero é conhecido por produzir ácido lático e butírico, além de hipurato, um metabólito (PHAM *et al.*, 2021)

O efeito do suco simbiótico de sapota-do-Solimões na microbiota intestinal foi avaliado com base nos índices de α -diversidade como é mostrado na Figura 12. As espécies aumentaram após fermentação colônica, sendo o SSS0 que apresentou o maior aumento de 315 para 467 após 48h de fermentação (Figura 12A). Enquanto o incremento para SSS30 foi de 296 para 334.

Figura 12- Parâmetros para a avaliação da alfa-diversidade da microbiota intestinal durante fermentação colônica do suco simbiótico de sapota-do-Solimões antes e após armazenamento a 4 °C. Suco de sapota-do-Solimões simbiótico (SSS0) e suco de sapota-do-Solimões simbiótico após 30 dias de armazenamento (SSS30)

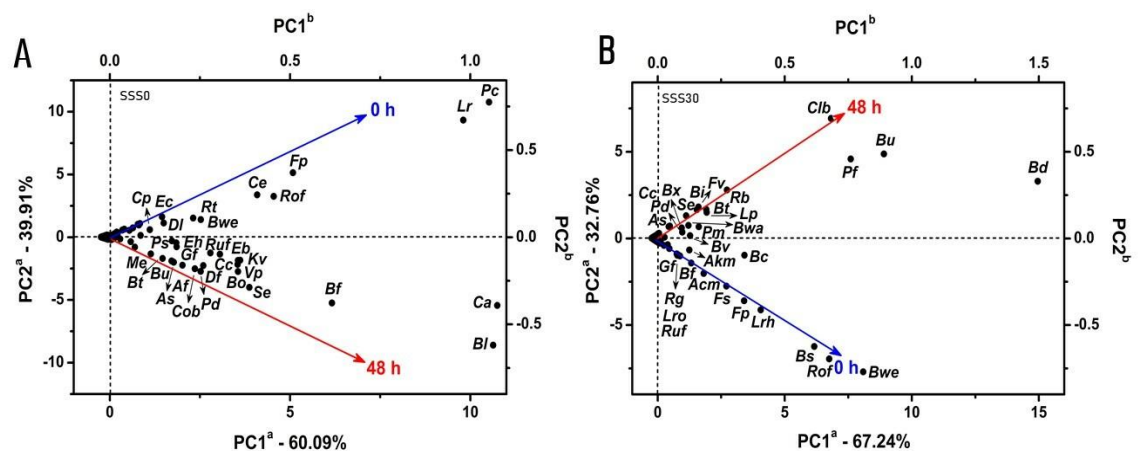


Fonte: Elaborada pela autora.

O índice de riqueza de espécies, Chao1, demonstrou esse resultado com o incremento Chao1 após a fermentação colônica nos dois tempos estudados (Figura 12B). O índice de diversidade (índice de Shannon) diminuiu para a amostra SSS30 48h, indicando que apesar do aumento das espécies essa amostra é menos diversa que a SSS30 0h (Figura 12C). A quantidade de FOS consumida e o período de ingestão interferem na diversidade e riqueza da microbiota intestinal. Por exemplo, a administração de 16g/dia de FOS a camundongos durante 14 dias, diminuiu Chao1, enquanto Shannon não mudou (LIU *et al.*, 2017). Por outro lado, em humanos 10g/dia de FOS durante 130 dias favoreceu o aumento de Chao1 e Shannon (TANDON *et al.*, 2019).

Os resultados do PCA mostraram as 30 espécies mais prevalentes para SSS0 e SSS30 (Figura 13). Os escores positivos do PC1 estão relacionados a maiores quantidades de espécies antes e depois da fermentação colônica. Além disso, o eixo PC2 foi relevante para a discriminação das amostras com base no período de fermentação (0 e 48 h). Uma modificação significativa da microbiota intestinal é mostrada para SSS0 48h, onde as seguintes espécies tiveram a maior abundância: Bl [*Blautia Blautia luti* (AJ133124)], Ca [*Collinsella Collinsella aerofaciens* (NR113316.1)], e Bf [*Blautia Blautia faisec* (HM626178)]. O SSS30 também foi modificado após 48h de fermentação tendo uma alta abundância das seguintes espécies: Bd [*Bacteroides Bacteroides dorei* (AB242142)], Bu [*Bacteroides Bacteroides uniformis* (AB050110)], Pf [*Phascolarctobacterium Phascolarctobacterium faecium* (X72865)], e Clb [*Clostridium XIVa Clostridium bolteae* (AJ508452)].

Figura 13- PCA biplot (loadings e escores) das espécies durante a fermentação colônica do suco simbiótico de sapota-do-Solimões antes e após armazenamento a 4 °C. A- Suco de sapota-do-Solimões simbiótico (SSS0) e B- suco de sapota-do-Solimões simbiótico após 30 dias de armazenamento (SSS30)



Acm - <i>Clostridium IV Acutalibacter muris</i>	Ca - <i>Collinsella Collinsella aerofaciens</i>	Lp - <i>Clostridium XIVa Lachnoclostridium pacaense</i>
Af - <i>Alistipes Alistipes finegoldii</i>	Clb - <i>Clostridium XIVa Clostridium bolteae</i>	Lr - <i>Lactobacillus Lactobacillus rhamnosus</i>
Akm - <i>Akkermansia Akkermansia muciniphila</i>	Cob - <i>Collinsella Collinsella bouchedurhanonensis</i>	Lro - <i>Lachnospiraceae incertae sedis Lactobacillus rogosae</i>
As - <i>Alistipes Alistipes shahii</i>	Cc - <i>Coprococcus Coprococcus comes</i>	Me - <i>Megasphaera Megasphaera elsdenii</i>
Bc - <i>Bacteroides Bacteroides clarus</i>	Ce - <i>Coprococcus Coprococcus eutactus</i>	Pc - <i>Prevotella Prevotella copri</i>
Bd - <i>Bacteroides Bacteroides dorei</i>	Cp - <i>Clostridium sensu stricto Clostridium perfringens</i>	Pd - <i>Parabacteroides Parabacteroides distasonis</i>
Bf - <i>Blautia Blautia faecis</i>	Df - <i>Dorea Dorea formicigenans</i>	Pf - <i>Phascolarctobacterium Phascolarctobacterium faecium</i>
Bi - <i>Bacteroides Bacteroides intestinalis</i>	DI - <i>Dorea Dorea longicatena</i>	Pm - <i>Parabacteroides merdae</i>
Bl - <i>Blautia Blautia luti</i>	Eb - <i>Holdemanella Eubacterium bifforme</i>	Ps - <i>Phascolarctobacterium Phascolarctobacterium succinatutens</i>
Bo - <i>Blautia Blautia obeum</i>	Ec - <i>Eubacterium Eubacterium coprostanoligenes</i>	Rb - <i>Aestuariispira Rhodospirillaceae bacterium</i>
Bs - <i>Bacteroides Bacteroides stercoris</i>	Eh - <i>Lachnospiraceae incertae sedis Eubacterium hallii</i>	Rg - <i>Lachnospiraceae incertae sedis Ruminococcus gnavus</i>
Bt - <i>Bacteroides Bacteroides thetaiotaomicron</i>	Fp - <i>Faecalibacterium Faecalibacterium prausnitzii</i>	Rof - <i>Roseburia Roseburia faecis</i>
Bu - <i>Bacteroides Bacteroides uniformis</i>	Fs - <i>Fusicatenibacter Fusicatenibacter saccharivorans</i>	RT - <i>Romboutsia Romboutsia timonensis</i>
Bv - <i>Bacteroides Bacteroides vulgatus</i>	Fv - <i>Fusobacterium varium</i>	Ruf - <i>Ruminococcus Ruminococcus faecis</i>
Bwa - <i>Blifhila Blifhila wadsworthia</i>	Gf - <i>Gemmiger Gemmiger formicilis</i>	Se - <i>Salmonella Salmonella enterica</i>
Bwe - <i>Blautia Blautia wexlerae</i>	Kv - <i>Kandleria Kandleria vitulina</i>	Vp - <i>Vagococcus Vagococcus penaei</i>
Bx - <i>Bacteroides Bacteroides xylanisolvens</i>		

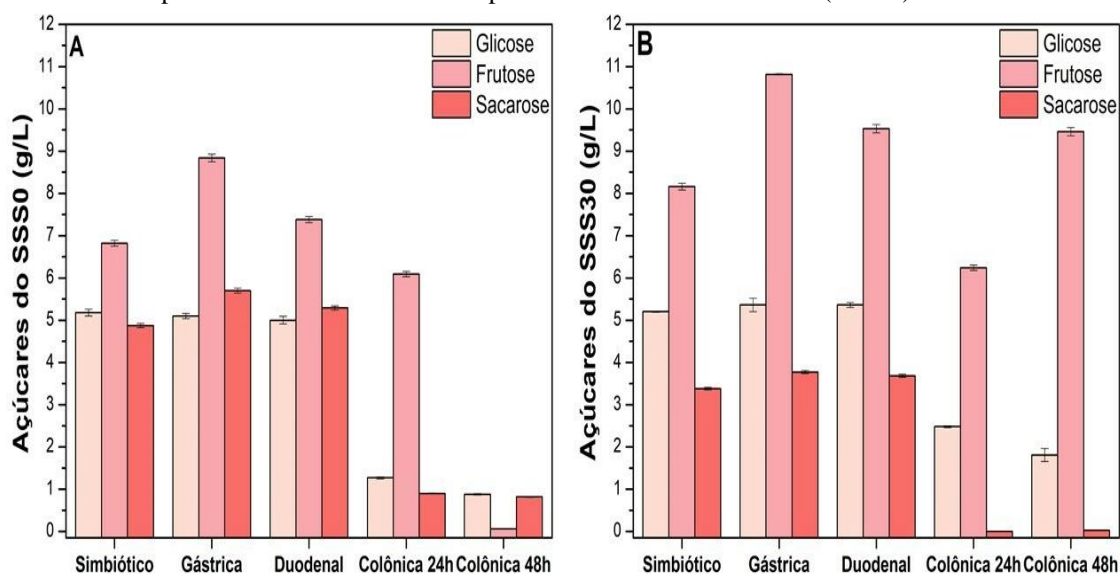
Fonte: Elaborada pela autora.

Espécies do gênero *Blautia* têm sido caracterizadas como um potencial probiótico, uma vez que mitiga doenças metabólicas e tem atividade antibacteriana contra microrganismos específicos. Os principais metabólitos da fermentação de glicose são ácido acético, ácido succínico e ácido lático (LIU *et al.*, 2021). Além disso, a melhoria da diversidade da microbiota intestinal principalmente com as espécies de *Blautia* foi associada à redução da mortalidade aguda por doenças enxerto-versus-hospedeiro (JENQ *et al.*, 2015). *Collinsella aerofaciens* é o *Actinobacterium* mais abundante no intestino humano saudável. Esta espécie pode diminuir a virulência e a patogenicidade modificando ácidos biliares (BAG; GHOSH; DAS, 2017). As espécies *Bacteroides* podem fermentar polissacarídeos e oligossacarídeos produzindo AGCC com efeitos benéficos no metabolismo da glicose e saciedade. Por exemplo, *B. uniformis* foi capaz de reduzir o ganho de peso corporal, colesterol, triglicerídeo e glicose em camundongos obesos (FABERSANI *et al.*, 2021).

5.12 Concentração de açúcares durante fermentação colônica do suco simbiótico de sapota-do-Solimões antes e após armazenamento a frio (4 °C)

Os microrganismos consumiram diferentes proporções de açúcares no suco simbiótico de sapota-do-Solimões, SSS0 e SSS30. A glicose, frutose e sacarose do SSS0 foram consumidas pelas bactérias da microbiota intestinal durante 48 horas de fermentação (Figura 14A). Em contrapartida, a microbiota intestinal de um doador diferente consumiu a sacarose do SSS30, enquanto o teor de glicose e frutose após 48h de fermentação foi de 2 g/L e 9 g/L, respectivamente (Figura 14B). As espécies do gênero *Streptococcus* têm sido destacadas como metabolizadora de frutose em amostras fecais, explicando o maior consumo de frutose em SSS0 48h, que tem maior abundância de *Streptococcus* (ver Figura 11) do que SSS30 48h (GUTIÉRREZ-SARMIENTO *et al.*, 2020). Prebióticos podem ser usados para melhorar o metabolismo da glicose porque promovem o crescimento de *Bifidobacterium* (mais abundante em SSS0 48h, ver Figura 11), bactérias fermentadoras de carboidratos, reduzindo as produtoras de butirato como *Bacteroides* e *Clostridia* (mais abundante em SSS30 48h, ver Figura 11) (LIU *et al.*, 2017).

Figura 14- Concentração de açúcares do suco simbiótico de sapota-do-Solimões durante fermentação colônica e antes e após 30 dias de armazenamento a 4 °C. A- Suco de sapota-do-Solimões simbiótico (SSS0) e B- suco de sapota-do-Solimões simbiótico após 30 dias de armazenamento (SSS30)



Fonte: Elaborada pela autora.

5.13 Concentração de ácidos orgânicos durante fermentação colônica do suco simbiótico de sapota-do-Solimões antes e após armazenamento a frio (4 °C)

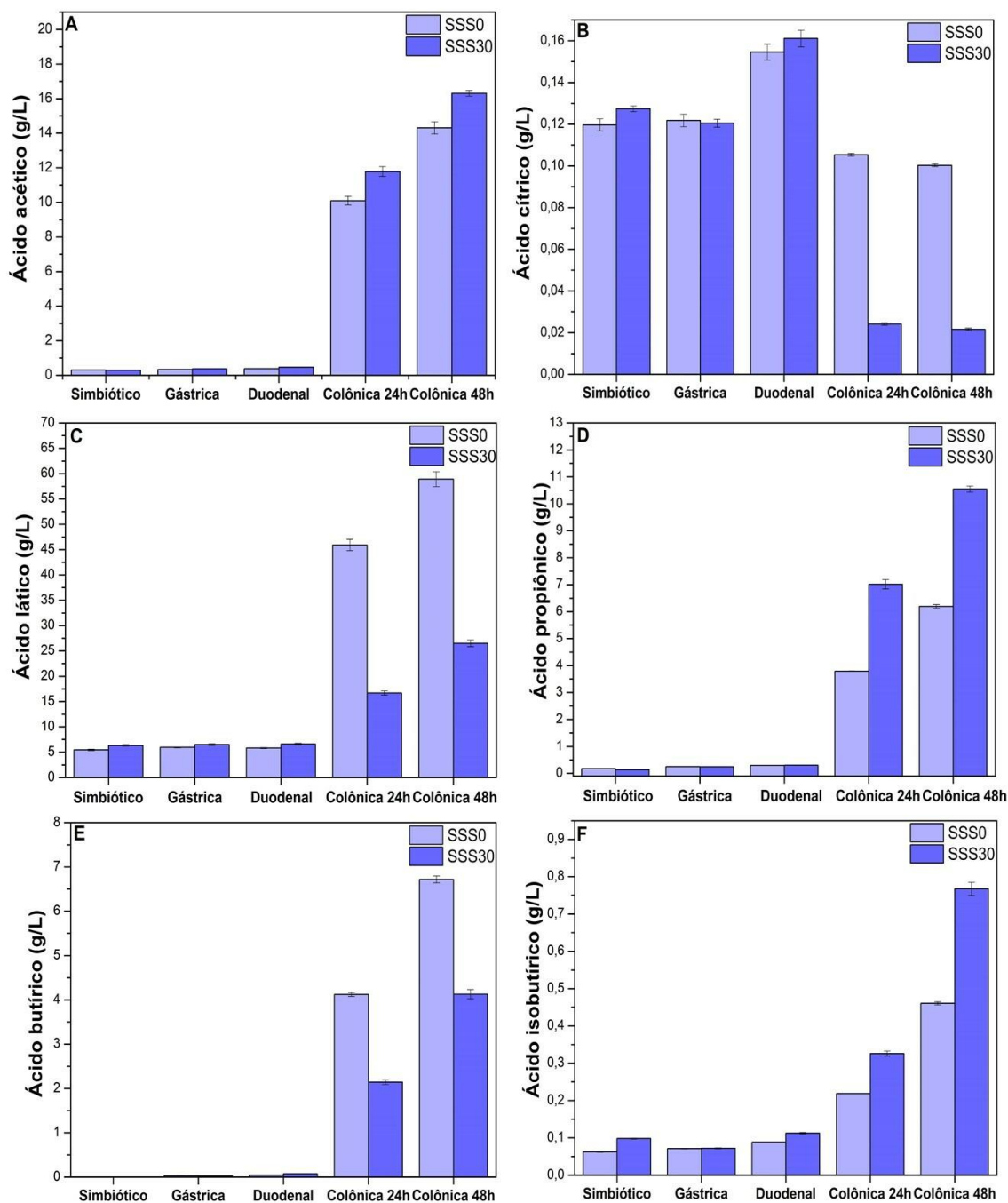
Os AGCC desempenham o papel fundamental na mediação dos efeitos benéficos à saúde humana. Estes importantes metabólitos tiveram sua concentração aumentada drasticamente no suco simbiótico SSS0 e SSS30 durante a fermentação colônica (Figura 15). SSS0 produziu mais láctico e butírico, enquanto o SSS30 acético, propiônico e isobutírico. O ácido láctico e acético podem ser metabolizados por microrganismos autóctones produzindo ácido propiônico e butírico (HENRIQUE-BANA *et al.*, 2020). Isso pode sugerir que o ácido láctico em SSS30 foi usado pela microbiota intestinal para produzir outros AGCC. O aumento do ácido propiônico em SSS30 após 48 h de fermentação colônica pode ser explicado pelo fato de que este é o AGCC mais produzido por *Clostridia*, e *Bacteroides*, predominante nesta amostra (ver Figura 11) (DUQUE *et al.*, 2021). Na Figura 15B é observado o consumo de ácido cítrico no SSS0 e SSS30, porém nesse último o consumo foi mais acentuado reduzindo em 8 vezes. O ácido cítrico pode diminuir os danos oxidativos e modular a microbiota intestinal,

principalmente reduzindo os microrganismos patogênicos e controlando o pH (CHEN *et al.*, 2018; MELAKU *et al.*, 2021).

Em estudos anteriores, a presença do prebiótico FOS aumentou a produção de AGCC por bactérias probióticas (FREIRE; RAMOS; SCHWAN, 2017; MACIEL DA SILVA; HENRIQUE CAMPELO; RODRIGUES, 2022). No entanto, as vias de produção e/ou consumo de AGCC estão relacionadas aos microrganismos da microbiota intestinal. Por exemplo, a via da fosfocetolose frutose-6-fosfato é a principal para a produção de acetato por *Bifidobacteria* (HENRIQUE-BANA *et al.*, 2020). Enquanto, os gêneros *Faecalibacterium* e *Roseburia* estão relacionados com a produção de ácido butírico via via Butyryl-CoA no cólon (KOH *et al.*, 2016).

Além disso, a microbiota intestinal de adultos após 14 dias de suplementação de FOS (16g/dia) diminuiu a produção de ácido butírico, isobutírico e acético. Os autores sugeriram que altas doses de prebióticos promovem a proliferação de *Bifidobacterium* com maior produção de ácido láctico, prejudicando o crescimento de patógenos oportunistas e bactérias produtoras de ácido butírico (LIU *et al.*, 2017). O suplemento contendo *Bifidobacterium lactis* Bb12 ou *Bifidobacterium lactis* HN019 com FOS (1% p/v) aumentou a produção de ácido butírico, isobutírico, propiônico e acético. Porém o ácido láctico foi totalmente consumido após 48h de fermentação (HENRIQUE-BANA *et al.*, 2020).

Figura 15- Concentração de ácidos orgânicos e ácidos graxos de cadeia curta do suco simbiótico de sapota-do-Solimões durante fermentação colônica e antes e após 30 dias de armazenamento a 4 °C. Suco de sapota-do-Solimões simbiótico (SSS0) e suco de sapota-do-Solimões simbiótico após 30 dias de armazenamento (SSS30)



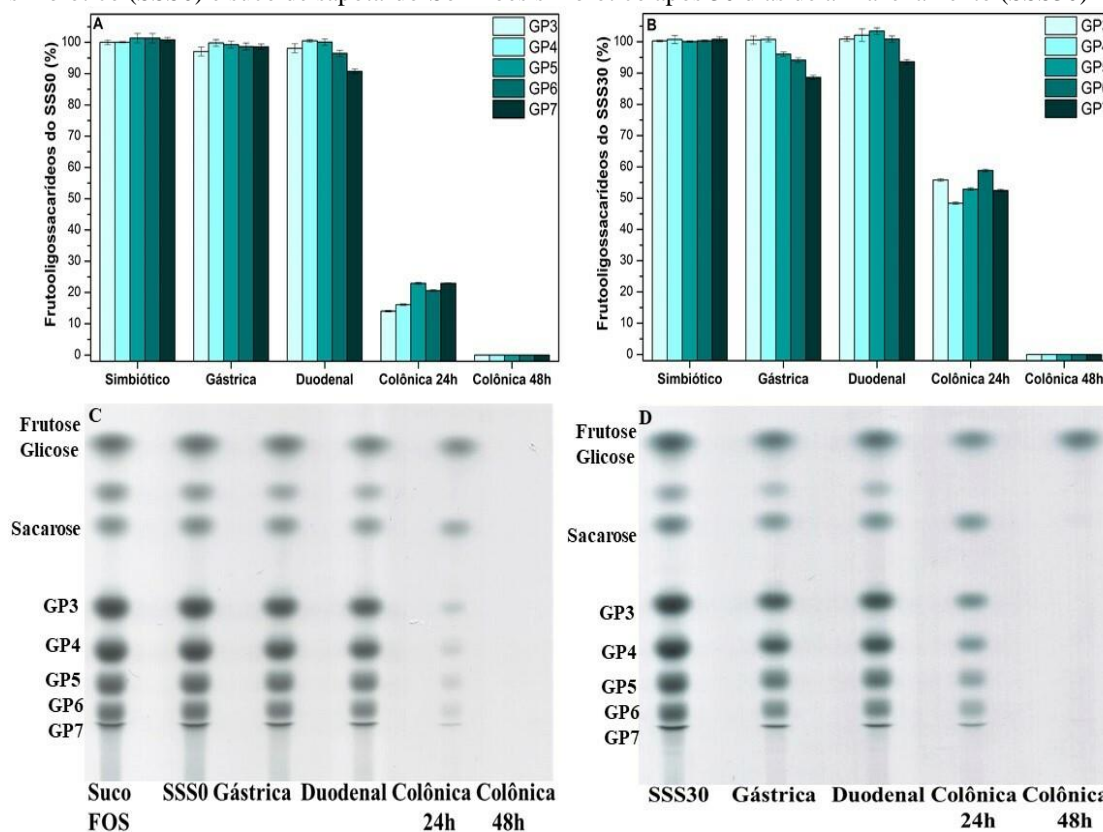
Fonte: Elaborada pela autora.

5.14 Concentração de frutooligossacarídeos durante fermentação colônica do suco simbiótico de sapota-do-Solimões antes e após armazenamento a frio (4 °C)

A avaliação do consumo do prebiótico pela microbiota probiótica e/ou autóctone em um suco simbiótico é bastante relevante. No entanto, muitos estudos não mostram esse aspecto. A Figura 16 mostra a integridade do FOS durante a digestão *in vitro* e o consumo pela microbiota colônica do suco de sapota-do-Solimões simbiótico por densitometria e cromatografia de camada delgada. Após 24h, a microbiota intestinal diminuiu a concentração relativa dos FOS para 20% e 50 % em SSS0 e SSS30, respectivamente (Figura 16A e B). Após 48h, os FOS foram completamente consumidos pelas duas microbiotas distintas tanto antes como após 30 dias de armazenamento (Figura 16 C e D). Os FOS não são digeridos por enzimas digestivas humanas podendo chegar ao intestino e favorecer o crescimento de bactérias benéficas (TANDON *et al.*, 2019). O maior consumo de FOS em SSS0 em 24h do que o SSS30 pode ser explicado pela maior abundância de *Bifidobacteria* (Ver Figura 11). Uma vez que as ligações $\beta(1\rightarrow 2)$ -glicosídicas podem ser facilmente degradadas por enzimas β -fructanosidasas das *Bifidobacteria* (DUQUE *et al.*, 2021). Depois da adição de FOS na dieta de camundongos, foi sugerido que o consumo de FOS também poderia ser atribuído ao gênero *Blautia* (aumento da abundância em SSS0 48h, ver Figura 11) uma vez que contêm genes relacionados ao transporte e hidrólise de FOS (MAO *et al.*, 2018).

O FOS é um prebiótico bem conhecido cientificamente e este estudo demonstrou as características que garantem suas propriedades funcionais como prebiótico (DAVANI-DAVARI *et al.*, 2019; DE FIGUEIREDO; DE BARROS RANKE; DE OLIVA-NETO, 2020). Assim, a Figura 16 mostra que o FOS é resistente a condições ácidas e enzimas digestivas, sendo completamente fermentado pela microbiota intestinal. A Figura 11 demonstrou como os FOS estimulam seletivamente o crescimento de bactérias intestinais benéficas (*Bifidobacterium*) promovendo uma microbiota intestinal mais saudável. Além disso, a mistura de *L. casei* B-442 e FOS produziu um suco simbiótico com grande potencial para benefícios à saúde, uma vez que aumentou a produção de AGCC e promoveu o crescimento de microrganismos intestinais benéficos (SWANSON *et al.*, 2020).

Figura 16- Concentração relativa de frutooligosacarídeos do suco simbiótico de sapota-do-Solimões durante fermentação colônica e antes e após 30 dias de armazenamento. Suco de sapota-do-Solimões simbiótico (SSS0) e suco de sapota-do-Solimões simbiótico após 30 dias de armazenamento (SSS30)

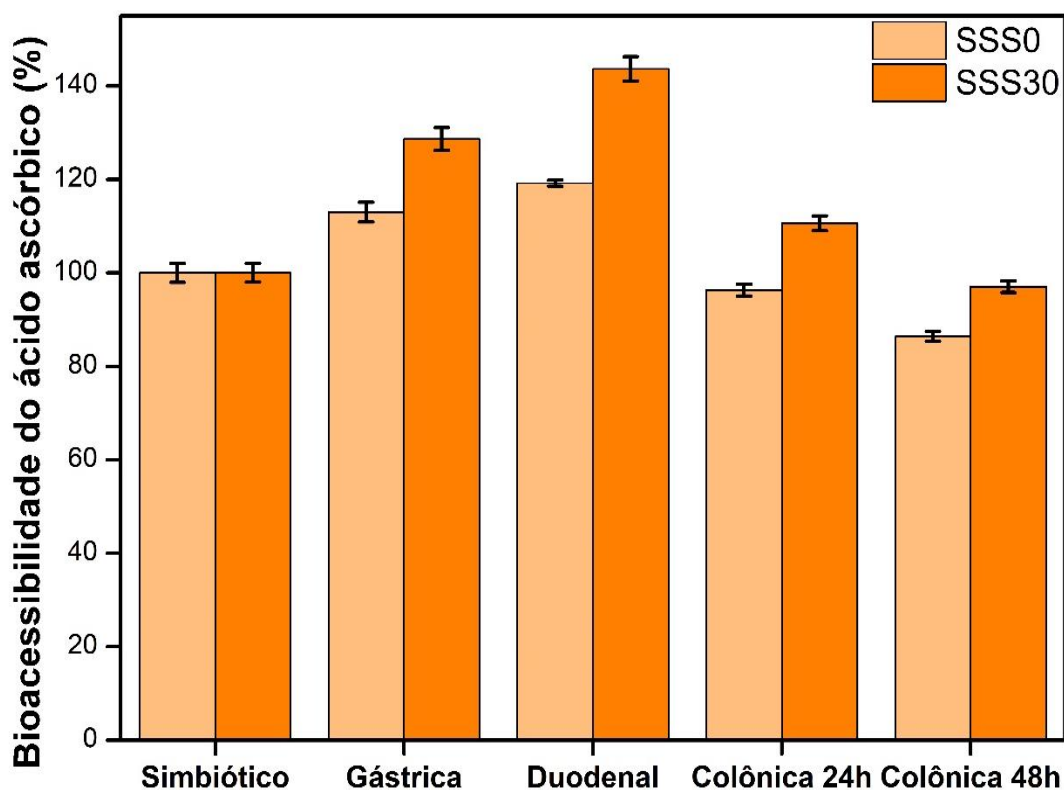


Fonte: Elaborada pela autora.

5.15 Bioacessibilidade do ácido ascórbico após fermentação colônica do suco simbiótico de sapota-do-Solimões antes e após armazenamento a frio (4 °C)

A Figura 17 apresenta a bioacessibilidade do ácido ascórbico no SSS durante a fermentação colônica antes e após o armazenamento. Como mostrado a bioacessibilidade do ácido ascórbico aumenta durante a digestão *in vitro* alcançando 120% e 140%, SSS0 e SSS30, respectivamente. Durante a fermentação colônica a bioacessibilidade diminuiu gradativamente chegando a 86% e 97% SSS0 e SSS30, respectivamente. O ácido ascórbico é muito instável podendo ter sido degradado por reações oxidativas devido ao tempo de exposição fatores como luz, temperatura e pH (MIRANDA *et al.*, 2019). A bioatividade do ácido ascórbico pode ser afetada pela alteração do pH durante a digestão *in vitro*, em pH ácido ele se encontra protonado no seu primeiro pKa (4,17) sendo mais estável (LEE *et al.*, 2022).

Figura 17- Bioacessibilidade do ácido ascórbico no suco de sapota-do-Solimões simbiótico antes e após 30 dias de armazenamento (4 °C). Suco de sapota-do-Solimões simbiótico (SSS0) e suco de sapota-do-Solimões simbiótico após 30 dias de armazenamento (SSS30)



Fonte: Elaborada pela autora.

O ácido ascórbico é um modulador eficiente da microbiota fecal, mas poucos estudos estão disponíveis sobre a sua relação com o microbioma intestinal. Dentre os efeitos relatados está a diminuição do pH fecal e do potencial redox. Além disso, as mudanças causadas por essa vitamina são vistas no aumento diversidade dos microrganismos, aumentando a abundância do filo Actinobacteria, e diminuindo Proteobacteria e Bacteroidetes, assim como o aumento da produção de AGCC (acético, propiônico e butírico) (PHAM *et al.*, 2021).

Um estudo recente demonstrou que a suplementação de vitamina C aumenta a abundância relativa da família *Lachnospiraceae* produtoras de ácido butírico na microbiota humana (OTTEN *et al.*, 2021). Esse aumento também foi visto para SSS0 48h que aumentou as bactérias do gênero *Lachnospiraceae incertae sedis* e *Blautia* (ver Figura 11).

A deficiência de ácido ascórbico pode provocar alterações inflamatórias intestinais através do estresse oxidativo no intestino (KAWADE *et al.*, 2020). O ácido ascórbico, como as outras vitaminas hidrossolúveis, é absorvido no intestino delgado, sendo o excesso secretado pela urina. A bioatividade do ácido ascórbico pode ser afetada pela idade, microbiota intestinal e condições adversas das fases de digestão *in vitro*. Um estudo recente, demonstrou que a estabilidade do ácido ascórbico durante digestão *in vitro* diminuiu devido as condições simuladas do intestino grosso e também foi afetado pela microbiota intestinal (LEE *et al.*, 2022).

6 CONCLUSÃO

O suco de sapota-do-Solimões apresentou características relevantes para a produção de sucos funcionais como concentração de açúcar, compostos fenólicos e ácido ascórbico, sendo uma ótima matriz para o crescimento do *L. casei* B-442. Os sucos produzidos SSP e SSS apresentaram contagem inicial de 11 log UFC/mL. O probiótico resistiu as condições gastrointestinais com contagens de aproximadamente 4 e 8 log UFC/mL, para SSP e SSS, respectivamente, após 6 h de digestão *in vitro*. A comparação com caldo MRS indicou que os componentes do suco exerceram um papel protetor com os probióticos, já que o caldo MRS apresentou contagem de viáveis abaixo do limite de detecção. O SSNF apresentou uma contagem de aproximadamente 6 log UFC/mL, ao fim da digestão *in vitro*, reforçando a ideia que as fibras do suco e outros componentes pode ter favorecido a maior viabilidade na matriz de sapota-do-Solimões.

Após 30 dias de armazenamento, as células probióticas mantiveram a contagem entre 4 e 8 log UFC/mL para SSP e SSS, respectivamente, após 6 h de digestão *in vitro*. Durante o armazenamento, foi observado pequenas variações de pH e Brix. Um aumento da concentração de compostos fenólicos 120 % foi constatado para o SSP durante o armazenamento, já o SSS manteve os 140%. Quanto a viabilidade do probiótico, esta diminuiu para o SSS chegando a uma taxa de sobrevivência de 82%. A cepa de *L. casei* B-442 foi capaz de metabolizar os açúcares do suco. Glicose e sacarose foram preferencialmente consumidas pelo SSP, enquanto SSS usou glicose, frutose e sacarose. Apesar de FOS não ter sido consumido pela cepa probiótica, a produção de AGCC foi mais proeminente para o SSS, sendo acético, láctico e propiônico os que mais

se destacaram. A bioacessibilidade do ácido ascórbico destacou o aumento da bioacessibilidade ao longo da digestão *in vitro*.

Diante dos resultados obtidos, o SSS foi submetido a fermentação colônica antes e após 30 dias de armazenamento. As duas microbiotas fecais usadas apresentaram diferentes modulações da microbiota intestinal. Os 4 filos mais abundantes foram Firmicutes, Proteobacteria, Bacteroidetes e Actinobacteria. Houve uma maior abundância das bactérias do gênero *Lactobacillus* nas amostras iniciais (SSS0 e SSS30). Enquanto, *Bifidobacterium* foi observado como um resultado do equilíbrio da microbiota causado pela suplementação com FOS. A presença do FOS foi mais efetiva em aumentar o índice de riquezas das espécies (Chao1) nas amostras SSS0 e SSS30. No entanto, a diversidade da SSS30 diminuiu após a fermentação colônica. O consumo de açúcares e FOS foi observado durante a fermentação colônica. Porém, o SSS30 após 48h de fermentação colônica não consumiu toda a frutose, sendo relacionado a uma menor abundância de bactérias do gênero *Streptococcus*, metabolizadora de frutose. A microbiota colônica favoreceu o consumo de ácido cítrico com um decaimento de 8 vezes. Os AGCC apresentaram, diferentes comportamentos sendo o acético e láctico mais prevalente no SSS0 e propiônico, butírico e isobutírico para SSS30. A bioacessibilidade do ácido ascórbico durante a fermentação colônica demonstrou a instabilidade desse ácido diante de condições entéricas e ao mesmo tempo um possível favorecimento a abundância de Actinobacteria.

Com isso, esse estudo demonstrou como o suco de sapota-do-Solimões é uma matriz com condições ótimas para o crescimento do probiótico *L. casei* B-442. Sua aplicação na produção de sucos probiótico e simbiótico garantiu a resistência diante de condições gastrointestinais com contagens entre 4 e 8 log UFC/mL, mesmo após o armazenamento. Além disso, o suco simbiótico promoveu um efeito positivo em microbiotas intestinais humanas, mesmo após armazenamento, sugerindo sua capacidade em promover benefícios a saúde do consumidor.

REFERÊNCIA

ABDEL-HAMID, M.; ROMEIH, E.; GAMBA, R. R.; NAGAI, E.; SUZUKI, T.; KOYANAGI, T.; ENOMOTO, T. The biological activity of fermented milk produced by *Lactobacillus casei* ATCC 393 during cold storage. **International Dairy Journal**, v. 91, p. 1–8, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2018.12.007>. Acesso em: 8 mar. 2021.

ABOULOIFA, H. *et al.* Antifungal activity of probiotic *Lactobacillus* strains isolated from natural fermented green olives and their application as food bio-preservative. **Biological Control**, v. 152, p. 104-450, 2021. Disponível em: <https://10.1016/j.biocontrol.2020.104450>. Acesso em: 8 mar. 2021.

ADEBOLA, O. O.; CORCORAN, O.; MORGAN, W. A. Prebiotics may alter bile salt hydrolase activity: Possible implications for cholesterol metabolism. **PharmaNutrition**, v. 12, p. 100-182, 2020. Disponível em: <https://10.1016/j.phanu.2020.100182>. Acesso em: 8 mar. 2021.

AFZAAL, M. *et al.* Survival and stability of free and encapsulated probiotic bacteria under simulated gastrointestinal conditions and in ice cream. **Food Sci Nutr**, v. 8, p. 1649-1656, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1002/fsn3.1451>. Acesso em: 23 nov. 2020.

ALEGRÍA, J.; HOYOS, O.; PRADO, J. Physicochemical characteristics of two variety zapote fruit (*Matisia cordata*) commercialized in departamento del Cauca. **Biotecnología en el sector agropecuario y agroindustrial**, Popayán, v. 5, n. 2, p. 32-38, 2007. Disponível em: <https://revistabiotecnologia.unicauca.edu.co/revista/index.php/biotecnologia/article/view/70/55>. Acesso em: 14 abr. 2022.

ALLIED MARKET RESEARCH, A. **Allied Market Research: Functional Beverages Market by Type (Energy Drinks, Sports drinks, Dairy-based beverages, Juices and Others), Distribution Channel (Supermarket and Hypermarket, Specialty Stores, E Commerce and Others), and End User (Athletes, Fitn.) 2021**. Disponível em: <https://www.alliedmarketresearch.com/functional-beverages-market-A13087>. Acesso em: 14 abr. 2022.

ALMADA-ÉRIX, C. N.; ALMADA, C. N.; SOUZA PEDROSA, G. T.; LOLLO, P. C.; MAGNANI, M.; SANT'ANA, A. S. Development of a semi-dynamic in vitro model and its testing using probiotic *Bacillus coagulans* GBI-30, 6086 in orange juice and yogurt. **Journal of Microbiological Methods**, v. 183, p. 106-187, 2021. Disponível em: <https://10.1016/j.mimet.2021.106187>. Acesso em: 14 abr. 2022.

ALMEIDA, F. D. L.; GOMES, W. F.; CAVALCANTE, R. S.; TIWARI, B. K.; CULLEN, P. J.; FRIAS, J. M.; BOURKE, P.; FERNANDES, F. A. N.; RODRIGUES, S. Fructooligosaccharides integrity after atmospheric cold plasma and high-pressure processing of a functional orange juice. **Food Research International**, v. 102, p. 282–290, 2017. Disponível em: <https://10.1016/j.foodres.2017.09.072>. Acesso em: 14 abr. 2022.

ALVES-SANTOS, A. M.; SUGIZAKI, C. S. A.; LIMA, G. C.; NAVES, M. M. V. Prebiotic effect of dietary polyphenols: A systematic review. **Journal of Functional Foods**, v. 74, p. 104-169, 2020. Disponível em: <https://10.1016/j.jff.2020.104169>. Acesso em: 14 dez. 2021.

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, p. 100-470, 2019. Disponível em: <https://10.1016/j.fbio.2019.100470>. Acesso em: 14 mar. 2022.

ANTUNES, A. E. C.; VINDEROLA, G.; XAVIER-SANTOS, D.; SIVIERI, K. Potential contribution of beneficial microbes to face the COVID-19 pandemic. **Food Research International**, v. 136, p. 109-577, 2020. Disponível em: <https://10.1016/j.foodres.2020.109577>. Acesso em: 25 abr. 2022.

ANVISA. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Alimentos com alegação de propriedades funcionais, novos alimentos/ingredientes, compostos bioativos e probióticos**. Disponível em: http://portal.anvisa.gov.br/resultado-de-busca?p_p_id=101&p_p_lifecycle=0&p_p_state=maximized&p_p_mode=view&p_p_col_id=column-1&p_...1/12. Acesso em: 8 mar. 2021.

ARNOLD, J. W.; SIMPSON, J. B.; ROACH, J.; KWINTKIEWICZ, J.; AZCARATE-PERIL, M. A. Intra-species genomic and physiological variability impact stress

resistance in strains of probiotic potential. **Frontiers in Microbiology**, v. 9, p. 242, 2018. Disponível em: <https://10.3389/fmicb.2018.00242>. Acesso em: 17 jun. 2022.

AYIMBILA, F.; SIRIWONG, S.; NAKPHAICHIT, M.; KEAWSOMPONG, S. In vitro gastrointestinal digestion of *Lentinus squarrosulus* powder and impact on human fecal microbiota. **Scientific Reports**, v. 12, n. 1, p. 2655, 2022. Disponível em: <https://10.1038/s41598-022-06648-z>. Acesso em: 15 abr. 2022.

BAG, S.; GHOSH, T. S.; DAS, B. Complete Genome Sequence of *Collinsella aerofaciens* Isolated from the Gut of a Healthy Indian Subject. **Genome Announcements**, v. 5, n. 47, 2017. Disponível em: <https://10.1128/genomeA.01361-17>. Acesso em: 13 jul. 2022.

BASSO, T. O.; GOMES, F. S.; LOPES, M. L.; DE AMORIM, H. V.; EGGLESTON, G.; BASSO, L. C. Homo- and heterofermentative lactobacilli differently affect sugarcane-based fuel ethanol fermentation. **Antonie van Leeuwenhoek**, v. 105, n. 1, p. 169–177, 2014. Disponível em: <https://10.1007/s10482-013-0063-6>. Acesso em: 14 fev. 2022.

BEHERA, S. S.; PANDA, S. K. Ethnic and industrial probiotic foods and beverages: efficacy and acceptance. **Current Opinion in Food Science**, v. 32, p. 29–36, 2020. Disponível em: <https://10.1016/j.cofs.2020.01.006>. Acesso em: 14 fev. 2022.

BERTO, A.; DA SILVA, A. F.; VISENTAINER, J. V.; MATSUSHITA, M.; DE SOUZA, N. E. Proximate compositions, mineral contents and fatty acid compositions of native Amazonian fruits. **Food Research International**, v. 77, p. 441–449, 2015 a. Disponível em: <https://10.1016/j.foodres.2015.08.018>. Acesso em: 14 abr. 2022.

BERTO, A.; RIBEIRO, A. B.; DE SOUZA, N. E.; FERNANDES, E.; CHISTÉ, R. C. Bioactive compounds and scavenging capacity of pulp, peel and seed extracts of the Amazonian fruit *Quararibea cordata* against ROS and RNS. **Food Research International**, v. 77, p. 236–243, 2015 b. Disponível em: <https://10.1016/j.foodres.2015.06.018>. Acesso em: 14 abr. 2022.

BETORET, E.; CALABUIG-JIMÉNEZ, L.; PATRIGNANI, F.; LANCIOTTI, R.; DALLA ROSA, M. Effect of high pressure processing and trehalose addition on functional properties of mandarin juice enriched with probiotic microorganisms. **LWT -**

Food Science and Technology, v. 85, p. 418–422, 2017. Disponível em:

<https://10.1016/j.lwt.2016.10.036>. Acesso em: 15 nov. 2022.

BRAGA, LÚCIA FILGUEIRAS ; SOUSA, MARCÍLIO PEREIRA ; CAMPOS, SÔNIA CASSINELLI BALDINI ; ISEPON, JACIRA DOS SANTOS ISEPON; MARINHO, HELIDE ALBUQUERQUE ; CASTRO, J. S. Characterization physical of sapota-do-Solimões (*Quararibea cordata* (Humb. & Bonpl.) Vischer, Bombacaceae).

Revista do Programa de Ciências Agro-Ambientais, Alta Floresta, v. 2, n. 1, p.32-39, 2003. Disponível em: http://www.unemat.br/revistas/rcaa/docs/vol2/3_artigo_v2.pdf.

Acesso em: 14 abr. 2022.

BRASIL, E.; HASSIMOTTO, N. M. A.; DEL CHIERICO, F.; MARINI, F.; QUAGLIARIELLO, A.; SCIUBBA, F.; MICCHELI, A.; PUTIGNANI, L.; LAJOLO, F. Daily Consumption of Orange Juice from *Citrus sinensis* L. Osbeck cv. Cara Cara and cv. Bahia Differently Affects Gut Microbiota Profiling as Unveiled by an Integrated Meta-Omics Approach. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 67, n. 5, p. 1381–1391, 2019. Disponível em: <https://10.1021/acs.jafc.8b05408>. Acesso em: 15 abr. 2022.

BUSTOS, A. Y.; FONT DE VALDEZ, G.; FADDA, S.; TARANTO, M. P. New insights into bacterial bile resistance mechanisms: the role of bile salt hydrolase and its impact on human health. **Food Research International**, v.112, p.250-262, 2018. Disponível em: <https://10.1016/j.foodres.2018.06.035>. Acesso em: 21 fev. 2022.

CARVALHO, VANIA SILVA ; DAMIANI, CLARISSA; ASQUIERI, E. R. Evaluation of physical and chemical parameters of the Sapota (*Quararibea cordata* Vischer): A fruit of the Amazon Brazilian. **Revista Verde de Agroecologia e Desenvolvimento Sustentável**, Pombal, v. 9, n. 2, p. 66–70, 2014. Disponível em: <https://www.gvaa.com.br/revista/index.php/RVADS/article/view/2199/2185>. Acesso em: 22 abr. 2022.

CARVALHO, V. S.; ASQUIERI, E. R.; DAMIANI, C. Ice cream production using the sapota pulp (*Quararibea cordata vischer*). **Agrarian**, Dourados, v. 11, n. 40, p. 189–194, 2018. Disponível em: <https://10.30612/agrarian.v11i40.7025>. Acesso em: 28 abr. 2022.

CARVALHO, V. S.; DAMIANI, C.; ASQUIERI, E. R.; ORSI, D. C.; NISHI, A. C. F. Development and antioxidant capacity of sapota pulp jelly (*Quararibea cordata* VISCHER). **Food Science And Technology**, v. 36, n. 3, p. 341–347, 2012. Disponível em: <https://10.1590/S1413-70542012000300010>. Acesso em: 14 jan. 2022.

CASTELLANOS FUENTES, A. P.; GENEVOIS, C. E.; FLORES, S. K.; DE ESCALADA PLA, M. F. Valorisation of soy by-products as substrate for food ingredients containing *L. casei* through solid state fermentation. **LWT**, v. 132, p. 109779, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2020.109779>. Acesso em: 3 jan. 2021.

CASTILLO, J. E.; MORENO, D. M.; RAMÍREZ, M. V. Evaluation of Cu, Mg, Fe and Na Metal Contents in Sapodilla Plum (*Quararibea cordata*) from Valle del Cauca, Colombia. **Ingeniería Solidaria**, Bogotá, v. 12, n. 19, p. 37–48, 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.16925/in.v12i19.1192>. Acesso em: 6 jan. 2021.

CASTRO-BRAVO, N.; WELLS, J. M.; MARGOLLES, A.; RUAS-MADIEDO, P. Interactions of surface exopolysaccharides from bifidobacterium and lactobacillus within the intestinal environment. **Frontiers Media**, v. 9, n. OCT, p. 2426, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.02426>. Acesso em: 3 jan. 2021.

CERÓN, I. X.; NG, R. T. L.; EL-HALWAGI, M.; CARDONA, C. A. Process synthesis for antioxidant polyphenolic compounds production from *Matisia cordata* Bonpl. (zapote) pulp. **Journal of Food Engineering**, v. 134, p. 5–15, 2014. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2014.02.010>. Acesso em: 10 set. 2021.

CHEN, S.; CAO, Y.; FERGUSON, L. R.; SHU, Q.; GARG, S. Flow cytometric assessment of the protectants for enhanced in vitro survival of probiotic lactic acid bacteria through simulated human gastro-intestinal stresses. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 95, n. 2, p. 345–356, 2012. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s00253-012-4030-3>. Acesso em: 10 set. 2020.

CHEN, Z.; ZHAO, S.; LIU, Y.; YANG, P.; AI, Q.; ZHANG, W.; XU, W.; ZHANG, Y.; ZHANG, Y.; MAI, K. Dietary citric acid supplementation alleviates soybean meal-induced intestinal oxidative damage and micro-ecological imbalance in juvenile turbot, *Scophthalmus maximus* L. **Aquaculture Research**, v. 49, n. 12, p. 3804–3816, 2018.

Disponível em: <https://doi.org/10.1111/ARE.13847>. Acesso em: 10 set. 2021.

CHENG, Y.; WU, T.; CHU, X.; TANG, S.; CAO, W.; LIANG, F.; FANG, Y.; PAN, S.; XU, X. Fermented blueberry pomace with antioxidant properties improves fecal microbiota community structure and short chain fatty acids production in an in vitro mode. **LWT**, v. 125, p. 109260, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/J.LWT.2020.109260>. Acesso em: 8 mar. 2022.

CILLA, A.; BOSCH, L.; BARBERÁ, R.; ALEGRÍA, A. Effect of processing on the bioaccessibility of bioactive compounds – A review focusing on carotenoids, minerals, ascorbic acid, tocopherols and polyphenols. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 68, p. 3–15, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.jfca.2017.01.009>. Acesso em: 15 mar. 2022.

COLLADO, M. C.; VINDEROLA, G.; SALMINEN, S. Postbiotics: Facts and open questions. A position paper on the need for a consensus definition. **Beneficial Microbes**, v. 10, n. 7, p. 711–719, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.3920/BM2019.0015>. Acesso em: 15 fev. 2021.

CORCORAN, B. M.; STANTON, C.; FITZGERALD, G. F.; ROSS, R. P. Survival of probiotic lactobacilli in acidic environments is enhanced in the presence of metabolizable sugars. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 71, n. 6, p. 3060–3067, 2005. Disponível em: <https://doi.org/10.1128/AEM.71.6.3060-3067.2005>. Acesso em: 10 set. 2020.

COSTA; FONTELES, T. V.; DE JESUS, A. L. T.; RODRIGUES, S. Sonicated pineapple juice as substrate for *L. casei* cultivation for probiotic beverage development: Process optimisation and product stability. **Food Chemistry**, v. 139, n. 1–4, p. 261–266, 2013 a. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2013.01.059>. Acesso em: 10 set. 2021.

COSTA; OOKI, G. N.; VIEIRA, A. D. S.; BEDANI, R.; SAAD, S. M. I. Synbiotic Amazonian palm berry (açai, *Euterpe oleracea* Mart.) ice cream improved *Lactobacillus rhamnosus* GG survival to simulated gastrointestinal stress. **Food and Function**, v. 8, n. 2, p. 731–740, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1039/c6fo00778c>. Acesso em: 10 set. 2021.

CUNNINGHAM, M. *et al.* Feature Review Shaping the Future of Probiotics and Prebiotics. **Trends in Microbiology**, v. 29, n. 8, p. 667-685, 2021 a. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.tim.2021.01.003>. Acesso em: 29 jun. 2021.

CUNNINGHAM, M. *et al.* Shaping the Future of Probiotics and Prebiotics. **Trends in Microbiology**, v. 29, n. 8, p. 667-685, 2021 b. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.tim.2021.01.003>. Acesso em: 29 jun. 2021.

DA COSTA, G. M.; DE CARVALHO SILVA, J. V.; MINGOTTI, J. D.; BARÃO, C. E.; KLOSOSKI, S. J.; PIMENTEL, T. C. Effect of ascorbic acid or oligofructose supplementation on *L. paracasei* viability, physicochemical characteristics and acceptance of probiotic orange juice. **LWT - Food Science and Technology**, v. 75, p. 195–201, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2016.08.051>. Acesso em: 29 jun. 2021.

DA SILVA, R. M.; PAIVA SOUZA, P. M.; FERNANDES, F. A. N.; GONÇALVES, L. R. B.; RODRIGUES, S. Co-immobilization of dextransucrase and dextranase in epoxy-agarose- tailoring oligosaccharides synthesis. **Process Biochemistry**, v. 78, n. July 2018, p. 71–81, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2019.01.009>. Acesso em: 29 jun. 2021.

DAVANI-DAVARI, D.; NEGAHDARIPOUR, M.; KARIMZADEH, I.; SEIFAN, M.; MOHKAM, M.; MASOUMI, S. J.; BERENJIAN, A.; GHASEMI, Y. Prebiotics: Definition, types, sources, mechanisms, and clinical applications. **FOODS**, v. 8, n. 3, p. 92, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/foods8030092>. Acesso em: 8 mar. 2021.

DE FIGUEIREDO, F. C.; DE BARROS RANKE, F. F.; DE OLIVA-NETO, P. Evaluation of xylooligosaccharides and fructooligosaccharides on digestive enzymes hydrolysis and as a nutrient for different probiotics and *Salmonella typhimurium*. **LWT**, v. 118, p. 108761, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2019.108761>. Acesso em: 10 dez. 2021.

DE LA ROSA, O.; FLORES-GALLEGOS, A. C.; MUÑÍZ-MARQUEZ, D.; NOBRE, C.; CONTRERAS-ESQUIVEL, J. C.; AGUILAR, C. N. Fructooligosaccharides production from agro-wastes as alternative low-cost source. **Trends in Food Science**

and Technology, v. 91, p. 139-146, 2019. Disponível em:

<https://doi.org/10.1016/j.tifs.2019.06.013>. Acesso em: 10 dez. 2021.

DE OLIVEIRA, S. D.; ARAÚJO, C. M.; BORGES, G. da S. C.; LIMA, M. dos S.;
VIERA, V. B.; GARCIA, E. F.; DE SOUZA, E. L.; DE OLIVEIRA, M. E. G.

Improvement in physicochemical characteristics, bioactive compounds and antioxidant activity of acerola (*Malpighia emarginata* D.C.) and guava (*Psidium guajava* L.) fruit by-products fermented with potentially probiotic lactobacilli. **LWT**, v. 134, p. 110200, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2020.110200>. Acesso em: 10 dez. 2021.

DE SOUZA, B. M. S.; BORGONOV, T. F.; CASAROTTI, S. N.; TODOROV, S. D.;
PENNA, A. L. B. *Lactobacillus casei* and *Lactobacillus fermentum* Strains Isolated from Mozzarella Cheese: Probiotic Potential, Safety, Acidifying Kinetic Parameters and Viability under Gastrointestinal Tract Conditions. **Probiotics and Antimicrobial Proteins**, v. 11, n. 2, p. 382–396, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s12602-018-9406-y>. Acesso em: 23 nov. 2020. Acesso em: 20 dez. 2021.

DIAS, C. O.; DOS SANTOS OPUSKI DE ALMEIDA, J.; PINTO, S. S.; DE
OLIVEIRA SANTANA, F. C.; VERRUCK, S.; MÜLLER, C. M. O.; PRUDÊNCIO, E.
S.; DE MELLO CASTANHO AMBONI, R. D. Development and physico-chemical characterization of microencapsulated bifidobacteria in passion fruit juice: A functional non-dairy product for probiotic delivery. **Food Bioscience**, v. 24, p. 26–36, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.fbio.2018.05.006>. Acesso em: 15 dez. 2021.

DÍAZ-GARCÍA, F. J.; FLORES-MEDINA, S.; SORIANO-BECERRIL, D. M.
Interplay between Human Intestinal Microbiota and Gut-to-Brain Axis: Relationship with Autism Spectrum Disorders. **Microorganisms**, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.5772/INTECHOPEN.89998>. Acesso em: 9 abr. 2022.

DIMASSI, H.; HAIDAR, S.; ISSA, S.; HASSAN, H. F. Food allergies and allergens: Characterization and perceptions among diagnosed food allergic individuals in Lebanon. **World Allergy Organization Journal**, v. 13, n. 11, p. 100481, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.waojou.2020.100481>. Acesso em: 10 mar. 2021.

DUDKIEWICZ, A.; MASMEJEAN, L.; ARNAUD, C.; ONARINDE, B.; SUNDARA, R.; POUR-TAGHI ANVARIAN, A.; TUCKER, N. Approaches for Improvement in Digestive Survival of Probiotics, a Comparative Study. **Polish Journal of Food and Nutrition Sciences**, v. 70, n. 3, p. 265–273, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.31883/pjfns/120184>. Acesso em: 9 set. 2020.

DUQUE, A. L. R. F.; DEMARQUI, F. M.; SANTONI, M. M.; ZANELLI, C. F.; ADORNO, M. A. T.; MILENKOVIC, D.; MESA, V.; SIVIERI, K. Effect of probiotic, prebiotic, and synbiotic on the gut microbiota of autistic children using an in vitro gut microbiome model. **Food Research International**, v. 149, p. 110657, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/J.FOODRES.2021.110657>. Acesso em: 13 abr. 2022.

ELSHAHEED, M. S.; MIRON, A.; APROTOSOAIIE, A. C.; FARAG, M. A. Pectin in diet: Interactions with the human microbiome, role in gut homeostasis, and nutrient-drug interactions. **Carbohydrate Polymers**, v. 255, p. 117388, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2020.117388>. Acesso em: 25 abr. 2022.

FABERSANI, E.; PORTUNE, K.; CAMPILLO, I.; LÓPEZ-ALMELA, I.; MONTSERRAT-DE LA PAZ, S.; ROMANÍ-PÉREZ, M.; BENÍTEZ-PÁEZ, A.; SANZ, Y. *Bacteroides uniformis* CECT 7771 alleviates inflammation within the gut-adipose tissue axis involving TLR5 signaling in obese mice. **Scientific Reports 2021 11:1**, v. 11, n. 1, p. 1–15, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/s41598-021-90888-y>. Acesso em: 9 abr. 2022.

FERREIRA-LAZARTE, A.; OLANO, A.; VILLAMIEL, M.; MORENO, F. J. Assessment of in Vitro Digestibility of Dietary Carbohydrates Using Rat Small Intestinal Extract. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 65, n. 36, p. 8046–8053, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.7b01809>. Acesso em: 14 abr. 2021.

FIGUEROA-GONZÁLEZ, I.; RODRÍGUEZ-SERRANO, G.; GÓMEZ-RUIZ, L.; GARCÍA-GARIBAY, M.; CRUZ-GUERRERO, A. Prebiotic effect of commercial saccharides on probiotic bacteria isolated from commercial products. **Food Science and Technology**, v. 39, n. 3, p. 747–753, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1590/fst.07318>. Acesso em: 12 abr. 2021.

- FIJAŁKOWSKI, K.; PEITLER, D.; RAKOCZY, R.; ZYWICKA, A. Survival of probiotic lactic acid bacteria immobilized in different forms of bacterial cellulose in simulated gastric juices and bile salt solution. **LWT - Food Science and Technology**, v. 68, p. 322–328, 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2015.12.038>. Acesso em: 21 abr. 2021.
- FOLEY, M. H.; O’FLAHERTY, S.; BARRANGOU, R.; THERIOT, C. M. Bile salt hydrolases: Gatekeepers of bile acid metabolism and host-microbiome crosstalk in the gastrointestinal tract. **PLoS Pathogens**, v. 15, n. 3, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1007581>. Acesso em: 2 jan. 2021.
- FONTELES, T. V.; COSTA, M. G. M.; DE JESUS, A. L. T.; RODRIGUES, S. Optimization of the Fermentation of Cantaloupe Juice by *Lactobacillus casei* NRRL B-442. **Food and Bioprocess Technology**, v. 5, n. 7, p. 2819–2826, 2012. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s11947-011-0600-0>. Acesso em: 12 dez. 2020.
- FOZO, E. M.; KAJFASZ, J. K.; QUIVEY, R. G. Low pH-induced membrane fatty acid alterations in oral bacteria. **FEMS Microbiology Letters**, v. 238, n. 2, p. 291–295, 2004. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.femsle.2004.07.047>. Acesso em: 25 fev. 2021.
- FREIRE, A. L.; RAMOS, C. L.; SCHWAN, R. F. Effect of symbiotic interaction between a fructooligosaccharide and probiotic on the kinetic fermentation and chemical profile of maize blended rice beverages. **Food Research International**, v. 100, p. 698–707, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2017.07.070>. Acesso em: 25 fev. 2021.
- GALLEGO-LOBILLO, P.; FERREIRA-LAZARTE, A.; HERNÁNDEZ-HERNÁNDEZ, O.; MONTILLA, A.; VILLAMIEL, M. Evaluation of the impact of a rat small intestinal extract on the digestion of four different functional fibers. **Food and Function**, v. 11, n. 5, p. 4081–4089, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1039/d0fo00236d>. Acesso em: 13 abr. 2021.
- GAO, X.; ZHAO, J.; ZHANG, H.; CHEN, W.; ZHAI, Q. Modulation of gut health using probiotics: the role of probiotic effector molecules. **Journal of Future Foods**, v. 2, n. 1, p. 1–12, 2022. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/J.JFUTFO.2022.03.011>.

Acesso em: 27 abr. 2022.

GAUCHER, F.; BONNASSIE, S.; RABAH, H.; MARCHAND, P.; BLANC, P.; JEANTET, R.; JAN, G. Review: Adaptation of beneficial propionibacteria, lactobacilli, and bifidobacteria improves tolerance toward technological and digestive stresses. **Frontiers in Microbiology**, v. 10, n. APR, p. 841, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.00841>. Acesso em: 25 fev. 2021.

GE, X. Y.; YUAN, J.; QIN, H.; ZHANG, W. G. Improvement of l-lactic acid production by osmotic-tolerant mutant of *Lactobacillus casei* at high temperature. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 89, n. 1, p. 73–78, 2011. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s00253-010-2868-9>. Acesso em: 25 fev. 2021.

GENEVOIS, C.; FLORES, S.; DE ESCALADA PLA, M. Byproduct from pumpkin (*Cucurbita moschata* Duchesne ex poiret) as a substrate and vegetable matrix to contain *Lactobacillus casei*. **Journal of Functional Foods**, v. 23, p. 210–219, 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.jff.2016.02.030>. Acesso em: 25 fev. 2021.

GIBSON, G. R. *et al.* Dietary prebiotics: current status and new definition. **Food Science & Technology Bulletin: Functional Foods**, v. 7, n. 1, p. 1–19, 2010. Disponível em: <https://doi.org/10.1616/1476-2137.15880>. Acesso em: 25 fev. 2021.

GIBSON, G. R. *et al.* Expert consensus document: The International Scientific Association for Probiotics and Prebiotics (ISAPP) consensus statement on the definition and scope of prebiotics. **Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology** 2017 14:8, v. 14, n. 8, p. 491–502, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/nrgastro.2017.75>. Acesso em: 27 abr. 2022.

GIUFFRIDA, D.; TORIBIO, E. M.; MURILLO, E. First complete quali-quantitative carotenoids characterization of *Aiphanes aculeata*, *Quararibea cordata* and *Garcinia intermedia* fruits. **Applied Food Research**, v. 2, n. 1, p. 100045, 2022. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/J.AFRES.2022.100045>. Acesso em: 25 fev. 2021.

GOMES, W. F.; TIWARI, B. K.; RODRIGUEZ, Ó.; DE BRITO, E. S.; FERNANDES, F. A. N.; RODRIGUES, S. Effect of ultrasound followed by high pressure processing on prebiotic cranberry juice. **Food Chemistry**, v. 218, p. 261–268, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2016.08.132>. Acesso em: 25 fev. 2021.

GUAN, N.; LIU, L. **Microbial response to acid stress: mechanisms and applications**, v. 104, n. 1, p. 51-65, 2020. Disponível em:

<https://doi.org/10.1007/s00253-019-10226-1>. Acesso em: 24 fev. 2021.

GUERREIRO, M. F.; APARECIDA, A.; DANTAS, S.; ANDRADE, J. D. S. Use of sapota Solimões (*Quararibea cordata* Vischer) in preparing iced tea. *In: CONGRESSO BRASILEIRO DE PROCESSAMENTO MÍNIMO E PÓS-COLHEITA DE FRUTAS, FLORES E HORTALIÇAS*, 1., 2015. Anais... Aracaju.

GUTIÉRREZ-SARMIENTO, W.; SÁYAGO-AYERDI, S. G.; GOÑI, I.; GUTIÉRREZ-MICELI, F. A.; ABUD-ARCHILA, M.; REJÓN-ORANTES, J. D. C.; RINCÓN-ROSALES, R.; PEÑA-OCAÑA, B. A.; RUÍZ-VALDIVIEZO, V. M. Changes in Intestinal Microbiota and Predicted Metabolic Pathways During Colonic Fermentation of Mango (*Mangifera indica* L.)—Based Bar Indigestible Fraction. **Nutrients**, v. 12, n. 3, p. 683, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/NU12030683>. Acesso em: 5 abr. 2022.

HAN, L.; PATIL, S.; BOEHM, D.; MILOSAVLJEVIĆ, V.; CULLEN, P. J.; BOURKE, P. Mechanisms of inactivation by high-voltage atmospheric cold plasma differ for *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 82, n. 2, p. 450–458, 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.1128/AEM.02660-15>. Acesso em: 5 abr. 2022.

HAN, X.; WU, H.; YU, P.; ZHANG, L.; ZHAO, S.; ZHANG, L. Glycine betaine transport conditions of *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* in salt induced hyperosmotic stress. **International Dairy Journal**, v. 86, p. 21–26, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2018.06.007>. Acesso em: 5 abr. 2022.

HASHEMI, S. M. B.; MOUSAVI KHANEGHAH, A.; BARBA, F. J.; NEMATI, Z.; SOHRABI SHOKOFTI, S.; ALIZADEH, F. Fermented sweet lemon juice (*Citrus limetta*) using *Lactobacillus plantarum* LS5: Chemical composition, antioxidant and antibacterial activities. **Journal of Functional Foods**, v. 38, p. 409–414, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.jff.2017.09.040>. Acesso em: 5 abr. 2022.

HENRIQUE-BANA, F. C.; WANG, X.; COSTA, G. N.; SPINOSA, W. A.; MIGLIORANZA, L. H. S.; SCORLETTI, E.; CALDER, P. C.; BYRNE, C. D.;

GIBSON, G. R. In vitro effects of Bifidobacterium lactis-based synbiotics on human faecal bacteria. **Food Research International**, v. 128, p. 108776, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/J.FOODRES.2019.108776>. Acesso em: 5 abr. 2022.

HILL, D.; SUGRUE, I.; TOBIN, C.; HILL, C.; STANTON, C.; ROSS, R. P. The Lactobacillus casei group: History and health related applications. **Frontiers in Microbiology**, v. 9, n. SEP, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.02107>. Acesso em: 12 dez. 2020.

HURTADO-ROMERO, A.; DEL TORO-BARBOSA, M.; GARCIA-AMEZQUITA, L. E.; GARCÍA-CAYUELA, T. Innovative technologies for the production of food ingredients with prebiotic potential: Modifications, applications, and validation methods. **Trends in Food Science and Technology**, v. 104, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2020.08.007>. Acesso em: 5 abr. 2022.

JENQ, R. R. *et al.* Intestinal Blautia Is Associated with Reduced Death from Graft-versus-Host Disease. **Biology of Blood and Marrow Transplantation**, v. 21, n. 8, p. 1373–1383, 2015. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/J.BBMT.2015.04.016>. Acesso em: 5 abr. 2022.

JORDAN, A.; HOYOS CONCHA, J. EVALUATION OF THE FRUIT ZAPOTE PULP BEHAVIOR (*Matisia cordata*) IN AGRO-INDUSTRIAL PROCESSES OF TRANSFORMATION. **Bioteología en el Sector Agropecuario y Agroindustrial: BSAA**, v. 3, n. 1, p. 41–46, 2005. Disponível em: <https://dialnet.unirioja.es/servlet/articulo?codigo=6117974>. Acesso em: 4 dez. 2019.

KAISER, J. C.; SEN, S.; SINHA, A.; WILKINSON, B. J.; HEINRICHS, D. E. The role of two branched-chain amino acid transporters in Staphylococcus aureus growth, membrane fatty acid composition and virulence. **Molecular Microbiology**, v. 102, n. 5, p. 850–864, 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.1111/mmi.13495>. Acesso em: 24 fev. 2021.

KAPLAN, H.; HUTKINS, R. W. Metabolism of fructooligosaccharides by Lactobacillus paracasei 1195. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 69, n. 4, p. 2217–2222, 2003. Disponível em: <https://doi.org/10.1128/AEM.69.4.2217-2222.2003>. Acesso em: 12 abr. 2021.

KAPRASOB, R.; KERDCHOECHUEN, O.; LAOHAKUNJIT, N.; SARKAR, D.; SHETTY, K. Fermentation-based biotransformation of bioactive phenolics and volatile compounds from cashew apple juice by select lactic acid bacteria. **Process Biochemistry**, v. 59, p. 141–149, 2017. Disponível em:

<https://doi.org/10.1016/j.procbio.2017.05.019>. Acesso em: 5 abr. 2022.

KAPRASOB, R.; KERDCHOECHUEN, O.; LAOHAKUNJIT, N.; SOMBOONPANYAKUL, P. B vitamins and prebiotic fructooligosaccharides of cashew apple fermented with probiotic strains *Lactobacillus* spp., *Leuconostoc mesenteroides* and *Bifidobacterium longum*. **Process Biochemistry**, v. 70, p. 9–19, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2018.04.009>. Acesso em: 5 abr. 2022.

KARIYAWASAM, K. M. G. M. M.; LEE, N. K.; PAIK, H. D. Synbiotic yoghurt supplemented with novel probiotic *Lactobacillus brevis* KU200019 and fructooligosaccharides. **Food Bioscience**, v. 39, p. 100835, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.fbio.2020.100835>. Acesso em: 5 abr. 2022.

KAWADE, N.; MURAI, A.; SUZUKI, W.; TAKEUCHI, K.; KONDO, M.; KOBAYASHI, M.; HORIO, F. Ascorbic acid deficiency induces hepatic and intestinal expression of inflammation-related genes irrespective of the presence or absence of gut microbiota in ODS rats. **The Journal of Nutritional Biochemistry**, v. 86, p. 108485, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/J.JNUTBIO.2020.108485>. Acesso em: 5 abr. 2022.

KOH, A.; DE VADDER, F.; KOVATCHEVA-DATCHARY, P.; BÄCKHED, F. From dietary fiber to host physiology: Short-chain fatty acids as key bacterial metabolites. **Cell**, v. 165, n. 6, p. 1332–1345, 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/J.CELL.2016.05.041>. Acesso em: 8 abr. 2022.

KUMAR, A.; KAUR, A.; TOMER, V. Process optimization for the development of a synbiotic beverage based on lactic acid fermentation of nutricereals and milk-based beverage. **LWT**, v. 131, p. 109774, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2020.109774>. Acesso em: 5 abr. 2022.

LARSEN, N.; CAHÚ, T. B.; ISAY SAAD, S. M.; BLENNOW, A.; JESPERSEN, L.

The effect of pectins on survival of probiotic *Lactobacillus* spp. in gastrointestinal juices is related to their structure and physical properties. **Food Microbiology**, v. 74, p. 11–20, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.fm.2018.02.015>. Acesso em: 5 abr. 2022.

LE MARREC, C. Responses of Lactic Acid Bacteria to Osmotic Stress. *In: Stress Responses of Lactic Acid Bacteria*. Springer US, 2011. p. 67–90. *E-book*. Disponível em: https://doi.org/10.1007/978-0-387-92771-8_4. Acesso em: 25 fev. 2021.

LEE, S. Y.; LEE, D. Y.; KANG, J. H.; KIM, J. H.; KIM, H. W.; OH, D. H.; JEONG, J. W.; KIM, B. K.; HUR, S. J. Effect of age-related in vitro human digestion with gut microbiota on antioxidative activity and stability of vitamins. **LWT**, v. 159, p. 113243, 2022. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/J.LWT.2022.113243>. Acesso em: 5 abr. 2022.

LEITE, A. K. F.; SANTOS, B. N.; FONTELES, T. V.; RODRIGUES, S. Cashew apple juice containing gluco-oligosaccharides, dextran, and tagatose promotes probiotic microbial growth. **Food Bioscience**, v. 42, n. dec, p. 101080, 2021 a. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.fbio.2021.101080>. Acesso em: 5 abr. 2022.

LEITE, A. K. F.; SANTOS, B. N.; FONTELES, T. V.; RODRIGUES, S. Cashew apple juice containing gluco-oligosaccharides, dextran, and tagatose promotes probiotic microbial growth. **Food Bioscience**, v. 42, p. 101080, 2021 b. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.fbio.2021.101080>. Acesso em: 5 abr. 2022.

LETERME, P.; BULDGEN, A.; ESTRADA, F.; LONDOÑO, A. M. Mineral content of tropical fruits and unconventional foods of the Andes and the rain forest of Colombia. **Food Chemistry**, v. 95, n. 4, p. 644–652, 2006. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2005.02.003>. Acesso em: 5 abr. 2022.

LI, C.; YU, W.; WU, P.; CHEN, X. D. Current in vitro digestion systems for understanding food digestion in human upper gastrointestinal tract. **Trends in Food Science and Technology**, v. 96, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2019.12.015>. Acesso em: 5 abr. 2022.

LI, T.; JIANG, T.; LIU, N.; WU, C.; XU, H.; LEI, H. Biotransformation of phenolic profiles and improvement of antioxidant capacities in jujube juice by select lactic acid bacteria. **Food Chemistry**, v. 339, p. 127859, 2021. Disponível em:

<https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2020.127859>. Acesso em: 5 abr. 2022.

LI, Y.; KAN, Z.; YOU, Y.; GAO, X.; WANG, Z.; FU, R. Exogenous transglutaminase improves multiple-stress tolerance in *Lactococcus lactis* and other lactic acid bacteria with glutamine and lysine in the cell wall. **Biotechnology Letters**, v. 37, n. 12, p. 2467–2474, 2015. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s10529-015-1942-x>. Acesso em: 5 abr. 2022.

LI; ZHANG, T.; LI, C.; ZHENG, S.; LI, H.; YU, J. Development of a microencapsulated synbiotic product and its application in yoghurt. **LWT**, v. 122, p. 109033, 2020 b. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2020.109033>. Acesso em: 5 abr. 2022.

LIONG, M. T.; SHAH, N. P. Effects of a *Lactobacillus casei* synbiotic on serum lipoprotein, intestinal microflora, and organic acids in rats. **Journal of Dairy Science**, v. 89, n. 5, p. 1390–1399, 2006. Disponível em: [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(06\)72207-X](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(06)72207-X). Acesso em: 5 abr. 2022.

LIU, F. *et al.* Fructooligosaccharide (FOS) and Galactooligosaccharide (GOS) Increase Bifidobacterium but Reduce Butyrate Producing Bacteria with Adverse Glycemic Metabolism in healthy young population. **Scientific Reports**, v. 7, n. 1, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/s41598-017-10722-2>. Acesso em: 5 abr. 2022.

LIU, X.; MAO, B.; GU, J.; WU, J.; CUI, S.; WANG, G.; ZHAO, J.; ZHANG, H.; CHEN, W. Blautia—a new functional genus with potential probiotic properties? **Gut Microbes**, v. 13, n. 1, p. 1–21, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1080/19490976.2021.1875796>. Acesso em: 9 abr. 2022.

LUCIANO, W. A.; MATTE, T. C.; PORTELA, I. A.; DE MEDEIROS, L. L.; DOS SANTOS LIMA, M.; MACIEL, J. F.; DE SOUZA, E. L.; GARCIA, E. F.; MAGNANI, M. Effects of *Lactobacillus acidophilus* LA-3 on physicochemical and sensory parameters of açai and mango based smoothies and its survival following simulated gastrointestinal conditions. **Food Research International**, v. 114, p. 159–168, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2018.08.005>. Acesso em: 5 abr. 2022.

MACIEL DA SILVA, R.; HENRIQUE CAMPELO, P.; RODRIGUES, S. In vitro viability of *L. Casei* B-442 and fructooligosaccharides integrity in Amazonian sapota-

do-solimões functional juice. **Food Research International**, v. 154, p. 111036, 2022. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/J.FOODRES.2022.111036>. Acesso em: 5 abr. 2022.

MANTZOURANI, I.; TERPOU, A.; ALEXOPOULOS, A.; BEZIRTZOGLU, E.; BEKATOROU, A.; PLESSAS, S. Production of a potentially synbiotic fermented Cornelian cherry (*Cornus mas* L.) beverage using *Lactobacillus paracasei* K5 immobilized on wheat bran. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 17, p. 347–351, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.bcab.2018.12.021>. Acesso em: 5 abr. 2022.

MANTZOURANI, I.; TERPOU, A.; BEKATOROU, A.; MALLOUCHOS, A.; ALEXOPOULOS, A.; KIMBARIS, A.; BEZIRTZOGLU, E.; KOUTINAS, A. A.; PLESSAS, S. Functional pomegranate beverage production by fermentation with a novel synbiotic *L. paracasei* biocatalyst. **Food Chemistry**, v. 308, p. 125658, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2019.125658>. Acesso em: 5 abr. 2022.

MAO, B.; GU, J.; LI, D.; CUI, S.; ZHAO, J.; ZHANG, H.; CHEN, W. Effects of different doses of fructooligosaccharides (FOS) on the composition of mice fecal microbiota, especially the bifidobacterium composition. **Nutrients**, v. 10, n. 8, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/nu10081105>. Acesso em: 8 abr. 2022.

MARKOWIAK-KOPEĆ, P.; ŚLIŻEWSKA, K. The effect of probiotics on the production of short-chain fatty acids by human intestinal microbiome. **Nutrients**, v. 12, n. 4, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/nu12041107>. Acesso em: 11 dez. 2020.

MARTINEZ, R. C. R.; AYNAOU, A. E.; ALBRECHT, S.; SCHOLS, H. A.; DE MARTINIS, E. C. P.; ZOETENDAL, E. G.; VENEMA, K.; SAAD, S. M. I.; SMIDT, H. In vitro evaluation of gastrointestinal survival of *Lactobacillus amylovorus* DSM 16698 alone and combined with galactooligosaccharides, milk and/or *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* Bb-12. **International Journal of Food Microbiology**, v. 149, n. 2, p. 152–158, 2011. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2011.06.010>. Acesso em: 5 abr. 2022.

MATIAS, N. S.; PADILHA, M.; BEDANI, R.; SAAD, S. M. I. In vitro gastrointestinal resistance of *Lactobacillus acidophilus* La-5 and *Bifidobacterium animalis* Bb-12 in soy and/or milk-based synbiotic apple ice creams. **International Journal of Food**

Microbiology, v. 234, p. 83–93, 2016. Disponível em:

<https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2016.06.037>. Acesso em: 5 abr. 2022.

MEIRA, Q. G. S.; MAGNANI, M.; DE MEDEIROS JÚNIOR, F. C.; QUEIROGA, R. de C. R. do E.; MADRUGA, M. S.; GULLÓN, B.; GOMES, A. M. P.; PINTADO, M. M. E.; DE SOUZA, E. L. Effects of added *Lactobacillus acidophilus* and

Bifidobacterium lactis probiotics on the quality characteristics of goat ricotta and their survival under simulated gastrointestinal conditions. **Food Research International**, v.

76, p. 828–838, 2015. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2015.08.002>.

Acesso em: 10 set. 2020.

MELAKU, M.; ZHONG, R.; HAN, H.; WAN, F.; YI, B.; ZHANG, H. Butyric and Citric Acids and Their Salts in Poultry Nutrition: Effects on Gut Health and Intestinal Microbiota. **International journal of molecular sciences**, v. 22, n. 19, 2021.

Disponível em: <https://doi.org/10.3390/IJMS221910392>. Acesso em: 14 abr. 2022.

MERCADANTE, A. Z.; RODRIGUES, D. B.; PETRY, F. C.; MARIUTTI, L. R. B. Carotenoid esters in foods - A review and practical directions on analysis and

occurrence. **Food Research International**, v. 99, p. 830–850, 2017. Disponível em:

<https://doi.org/10.1016/j.foodres.2016.12.018>. Acesso em: 21 out. 2019.

MIRANDA, R. F.; DE PAULA, M. M.; DA COSTA, G. M.; BARÃO, C. E.; DA SILVA, A. C. R.; RAICES, R. S. L.; GOMES, R. G.; PIMENTEL, T. C. Orange juice added with *L. casei*: is there an impact of the probiotic addition methodology on the

quality parameters? **LWT**, v. 106, p. 186–193, 2019. Disponível em:

<https://doi.org/10.1016/j.lwt.2019.02.047>. Acesso em: 5 abr. 2022.

MOHANTY, D.; MISRA, S.; MOHAPATRA, S.; SAHU, P. S. Prebiotics and

synbiotics: Recent concepts in nutrition. **Food Bioscience**, 2018. Disponível em:

<https://doi.org/10.1016/j.fbio.2018.10.008>. Acesso em: 5 abr. 2022.

MONTEIRO, S. S.; KARNOPP, G.; MICHELON, N.; ARANTES, A. C. N. R.;

MONEGO, M. A.; KIPPER, D. K.; SOQUETTA, M. B.; WAGNER, R.; ROSA, C. S.

da. Influencia de la preservación térmica sobre las características físico-químicas, microbiológicas y compuestos bioactivos de la pulpa de sapota-do-Solimões (*Quararibea cordata*). **CYTA - Journal of Food**, v. 16, n. 1, p. 85–95, 2018 a. Disponível em: <https://doi.org/10.1080/19476337.2017.1340342>. Acesso em: 5 abr. 2022.

MONTEIRO, S. S.; KARNOPP, G.; MICHELON, N.; ARANTES, A. C. N. R.; MONEGO, M. A.; KIPPER, D. K.; SOQUETTA, M. B.; WAGNER, R.; ROSA, C. S. da. Influence of preservation by heat and cold on the physicochemical and microbiological characteristics, bioactive compounds of pulp from sapota-do-Solimões (*Quararibea cordata*). **CyTA - Journal of Food**, v. 16, n. 1, p. 85–95, 2018 b. Disponível em: <https://doi.org/10.1080/19476337.2017.1340342>. Acesso em: 1 abr. 2020.

MONTEIRO, S. S.; RIBEIRO, S. R.; SOQUETTA, M. B.; PIRES, F. J.; WAGNER, R.; DA ROSA, C. S. Evaluation of the chemical, sensory and volatile composition of sapota-do-Solimões pulp at different ripening stages. **Food Research International**, v. 109, p. 159–167, 2018 c. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2018.04.033>. Acesso em: 5 abr. 2022.

MORAIS, S. G. G.; DA SILVA CAMPELO BORGES, G.; DOS SANTOS LIMA, M.; MARTÍN-BELLOSO, O.; MAGNANI, M. Effects of probiotics on the content and bioaccessibility of phenolic compounds in red pitaya pulp. **Food Research International**, v. 126, p. 108681, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2019.108681>. Acesso em: 5 abr. 2022.

MUHALDIN, B. J.; KADUM, H.; MEOR HUSSIN, A. S. Metabolomics profiling of fermented cantaloupe juice and the potential application to extend the shelf life of fresh cantaloupe juice for six months at 8 °C. **Food Control**, v. 120, p. 107555, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2020.107555>. Acesso em: 5 abr. 2022.

MULTARI, S.; CARAFA, I.; BARP, L.; CARUSO, M.; LICCIARDELLO, C.; LARCHER, R.; TUOHY, K.; MARTENS, S. Effects of *Lactobacillus* spp. on the phytochemical composition of juices from two varieties of *Citrus sinensis* L. Osbeck: ‘Tarocco’ and ‘Washington navel’. **LWT**, v. 125, p. 109205, 2020. Disponível em:

<https://doi.org/10.1016/j.lwt.2020.109205>. Acesso em: 5 abr. 2022.

MUÑIZ-MÁRQUEZ, D. B.; CONTRERAS, J. C.; RODRÍGUEZ, R.; MUSSATTO, S. I.; TEIXEIRA, J. A.; AGUILAR, C. N. Enhancement of fructosyltransferase and fructooligosaccharides production by *A. oryzae* DIA-MF in Solid-State Fermentation using aguamiel as culture medium. **Bioresource Technology**, v. 213, p. 276–282, 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2016.03.022>. Acesso em: 5 abr. 2022.

MURILLO, E.; GIUFFRIDA, D.; MENCHACA, D.; DUGO, P.; TORRE, G.; MELÉNDEZ-MARTINEZ, A. J.; MONDELLO, L. Native carotenoids composition of some tropical fruits. **Food Chemistry**, v. 140, n. 4, p. 825–836, 2013. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2012.11.014>. Acesso em: 21 out. 2019.

MURILLO, E.; MELÉNDEZ-MARTÍNEZ, A. J.; PORTUGAL, F. Screening of vegetables and fruits from Panama for rich sources of lutein and zeaxanthin. **Food Chemistry**, v. 122, n. 1, p. 167–172, 2010. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2010.02.034>. Acesso em: 5 abr. 2022.

MUSTAFA, S. M.; CHUA, L. S.; EL-ENSHASY, H. A.; ABD MAJID, F. A.; HANAPI, S. Z. Kinetic profile and anti-diabetic potential of fermented *Punica granatum* juice using *Lactobacillus casei*. **Process Biochemistry**, v. 92, p. 224–231, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2020.01.014>. Acesso em: 5 abr. 2022.

NANNEN, N. L.; HUTKINS, R. W. Proton-Translocating Adenosine Triphosphatase Activity in Lactic Acid Bacterial. **Journal of Dairy Science**, v. 74, n. 3, p. 747–751, 1991. Disponível em: [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(91\)78220-9](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(91)78220-9). Acesso em: 5 abr. 2022.

NOBRE, C.; SOUSA, S. C.; SILVA, S. P.; PINHEIRO, A. C.; COELHO, E.; VICENTE, A. A.; GOMES, A. M. P.; COIMBRA, M. A.; TEIXEIRA, J. A.; RODRIGUES, L. R. In vitro digestibility and fermentability of fructo-oligosaccharides produced by *Aspergillus ibericus*. **Journal of Functional Foods**, v. 46, p. 278–287, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.jff.2018.05.004>. Acesso em: 13 abr. 2021.

NOVÁK, L.; ZUBÁČOVÁ, Z.; KARNKOWSKA, A.; KOLISKO, M.; HROUDOVÁ, M.; STAIRS, C. W.; SIMPSON, A. G. B. B.; KEELING, P. J.; ROGER, A. J.;

ČEPIČKA, I.; HAMPL, V. Arginine deiminase pathway enzymes: evolutionary history in metamonads and other eukaryotes. **BMC Evolutionary Biology**, v. 16, n. 1, p. 1–14, 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.1186/s12862-016-0771-4>. Acesso em: 24 fev. 2021.

NÚÑEZ-SÁNCHEZ, M. A.; HERISSON, F. M.; CLUZEL, G. L.; CAPLICE, N. M. Metabolic syndrome and synbiotic targeting of the gut microbiome. **Current Opinion in Food Science**, v. 41, p. 60–69, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.cofs.2021.02.014>. Acesso em: 7 mar. 2021.

O'CALLAGHAN, A.; VAN SINDEREN, D. Bifidobacteria and their role as members of the human gut microbiota. **Frontiers in Microbiology**, v. 7, n. JUN, p. 925, 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.00925>. Acesso em: 5 abr. 2022.

ODDI, S.; HUBER, P.; ROCHA FARIA DUQUE, A. L.; VINDEROLA, G.; SIVIERI, K. Breast-milk derived potential probiotics as strategy for the management of childhood obesity. **Food Research International**, v. 137, p. 109673, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2020.109673>. Acesso em: 5 abr. 2022.

OLAIMAT, A. N.; AOLYMAT, I.; AL-HOLY, M.; AYYASH, M.; ABU GHOUSH, M.; AL-NABULSI, A. A.; OSAILI, T.; APOSTOLOPOULOS, V.; LIU, S. Q.; SHAH, N. P. The potential application of probiotics and prebiotics for the prevention and treatment of COVID-19. **npj Science of Food**, v. 4, n. 1, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/s41538-020-00078-9>. Acesso em: 5 abr. 2022.

OLIPHANT, K.; ALLEN-VERCOE, E. Macronutrient metabolism by the human gut microbiome: Major fermentation by-products and their impact on host health. **Microbiome**, v. 7, n. 1, p. 1–15, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1186/s40168-019-0704-8>. Acesso em: 5 abr. 2022.

OLIVARES, A.; SOTO, C.; CABALLERO, E.; ALTAMIRANO, C. Survival of microencapsulated *Lactobacillus casei* (prepared by vibration technology) in fruit juice during cold storage. **Electronic Journal of Biotechnology**, v. 42, p. 42–48, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.ejbt.2019.10.002>. Acesso em: 5 abr. 2022.

OTTEN, A. T.; BOURGONJE, A. R.; PETERS, V.; ALIZADEH, B. Z.; DIJKSTRA, G.; HARMSSEN, H. J. M. Vitamin C Supplementation in Healthy Individuals Leads to

Shifts of Bacterial Populations in the Gut—A Pilot Study. **Antioxidants**, v. 10, n. 8, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/ANTIOX10081278>. Acesso em: 1 maio. 2022.

PAIXÃO, L. M. N.; FONTELES, T. V.; OLIVEIRA, V. S.; FERNANDES, F. A. N.; RODRIGUES, S. Cold Plasma Effects on Functional Compounds of Siriguela Juice. **Food and Bioprocess Technology**, v. 12, n. 1, p. 110–121, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s11947-018-2197-z>. Acesso em: 15 abr. 2020.

PALMA-OROZCO, G.; ORTIZ-MORENO, A.; DORANTES-ÁLVAREZ, L.; SAMPEDRO, J. G.; NÁJERA, H. Purification and partial biochemical characterization of polyphenol oxidase from mamey (*Pouteria sapota*). **Phytochemistry**, v. 72, n. 1, p. 82–88, 2011. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/J.PHYTOCHEM.2010.10.011>. Acesso em: 30 set. 2019.

PAPADIMITRIOU, K. *et al.* Stress Physiology of Lactic Acid Bacteria. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 80, n. 3, p. 837–890, 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.1128/membr.00076-15>. Acesso em: 2 jan. 2021.

PARADA, A. E.; NEEDHAM, D. M.; FUHRMAN, J. A. Every base matters: Assessing small subunit rRNA primers for marine microbiomes with mock communities, time series and global field samples. **Environmental Microbiology**, v. 18, n. 5, p. 1403–1414, 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.1111/1462-2920.13023>. Acesso em: 5 abr. 2022.

PEREIRA, A. L. F.; ALMEIDA, F. D. L.; DE JESUS, A. L. T.; DA COSTA, J. M. C.; RODRIGUES, S. Storage Stability and Acceptance of Probiotic Beverage from Cashew Apple Juice. **Food and Bioprocess Technology**, v. 6, n. 11, p. 3155–3165, 2013 a. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s11947-012-1032-1>. Acesso em: 5 abr. 2022.

PEREIRA, A. L. F.; ALMEIDA, F. D. L.; DE JESUS, A. L. T.; DA COSTA, J. M. C.; RODRIGUES, S. Storage Stability and Acceptance of Probiotic Beverage from Cashew Apple Juice. **Food and Bioprocess Technology**, v. 6, n. 11, 2013 b. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s11947-012-1032-1>. Acesso em: 5 abr. 2022.

PEREIRA, A. L. F.; FEITOSA, W. S. C.; ABREU, V. K. G.; LEMOS, T. de O.; GOMES, W. F.; NARAIN, N.; RODRIGUES, S. Impact of fermentation conditions on

the quality and sensory properties of a probiotic cupuassu (*Theobroma grandiflorum*) beverage. **Food Research International**, v. 100, p. 603–611, 2017 a. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2017.07.055>. Acesso em: 5 abr. 2022.

PEREIRA; FEITOSA, W. S. C.; ABREU, V. K. G.; LEMOS, T. de O.; GOMES, W. F.; NARAIN, N.; RODRIGUES, S. Impact of fermentation conditions on the quality and sensory properties of a probiotic cupuassu (*Theobroma grandiflorum*) beverage. **Food Research International**, v. 100, p. 603–611, 2017 b. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2017.07.055>. Acesso em: 11 dez. 2020.

PEREIRA; MACIEL, T. C.; RODRIGUES, S. Probiotic beverage from cashew apple juice fermented with *Lactobacillus casei*. **Food Research International**, v. 44, n. 5, p. 1276–1283, 2011. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2010.11.035>. Acesso em: 5 abr. 2022.

PHAM, V. T.; FEHLBAUM, S.; SEIFERT, N.; RICHARD, N.; BRUINS, M. J.; SYBESMA, W.; REHMAN, A.; STEINERT, R. E. Effects of colon-targeted vitamins on the composition and metabolic activity of the human gut microbiome— a pilot study. **Gut Microbes**, v. 13, n. 1, p. 1–20, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1080/19490976.2021.1875774>. Acesso em: 5 abr. 2022.

PIMENTEL, T. C. *et al.* **Fruit juices as probiotic foods. Sports and energy drinks the science of beverages**. Duxford, Cambridgeshire, Woodhead Publishing, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-815851-7.00014-0>. Acesso em: 5 abr. 2022.

POURMASOUMI, M.; NAJAFGHOLIZADEH, A.; HADI, A.; MANSOUR-GHANAIEI, F.; JOUKAR, F. The effect of synbiotics in improving *Helicobacter pylori* eradication: A systematic review and meta-analysis. **Complementary Therapies in Medicine**, v. 43, p. 36-43, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.ctim.2019.01.005>. Acesso em: 5 abr. 2022.

PRANCE, G. T. **Fruits Of Tropical Climates Fruits of Central and South America II Encyclopedia of Food Sciences and Nutrition**. Reading, Berkshire: Academic Press, 2003.

QI, Y.; YU, L.; TIAN, F.; ZHAO, J.; ZHANG, H.; CHEN, W.; ZHAI, Q. A.

muciniphila Supplementation in Mice during Pregnancy and Lactation Affects the Maternal Intestinal Microenvironment. **Nutrients**, v. 14, n. 2, p. 390, 2022. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/nu14020390>. Acesso em: 9 set. 2021.

QUATRIN, A. *et al.* Bioaccessibility and catabolism of phenolic compounds from jaboticaba (*Myrciaria trunciflora*) fruit peel during in vitro gastrointestinal digestion and colonic fermentation. **Journal of Functional Foods**, v. 65, p. 103714, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.jff.2019.103714>. Acesso em: 9 set. 2021.

RADICIONI, M.; KOIRALA, R.; FIORE, W.; LEURATTI, C.; GUGLIELMETTI, S.; ARIOLI, S. Survival of *L. casei* DG® (*Lactobacillus paracasei* CNCMI1572) in the gastrointestinal tract of a healthy paediatric population. **European Journal of Nutrition**, v. 58, n. 8, p. 3161–3170, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s00394-018-1860-5>. Acesso em: 9 set. 2020.

REALE, A.; DI RENZO, T.; ROSSI, F.; ZOTTA, T.; IACUMIN, L.; PREZIUSO, M.; PARENTE, E.; SORRENTINO, E.; COPPOLA, R. Tolerance of *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus paracasei* and *Lactobacillus rhamnosus* strains to stress factors encountered in food processing and in the gastro-intestinal tract. **LWT**, v. 60, n. 2, p. 721–728, 2015. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2014.10.022>. Acesso em: 9 set. 2020.

REALE, A.; IANNIELLO, R. G.; CIOCIA, F.; DI RENZO, T.; BOSCAINO, F.; RICCIARDI, A.; COPPOLA, R.; PARENTE, E.; ZOTTA, T.; MCSWEENEY, P. L. H. Effect of respirative and catalase-positive *Lactobacillus casei* adjuncts on the production and quality of Cheddar-type cheese. **International Dairy Journal**, v. 63, p. 78–87, 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2016.08.005>. Acesso em: 9 set. 2020.

REZENDE, E. S. V.; LIMA, G. C.; NAVES, M. M. V. Dietary fibers as beneficial microbiota modulators: a proposal classification by prebiotic categories. **Nutrition**, v. 89, p. 111217, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.nut.2021.111217>. Acesso em: 10 mar. 2021.

RIBEIRO, A. B.; BERTO, A.; CHISTÉ, R. C.; FREITAS, M.; VISENTAINER, J. V.; FERNANDES, E. Bioactive compounds and scavenging capacity of extracts from

different parts of *Vismia cauliflora* against reactive oxygen and nitrogen species.

Pharmaceutical Biology, v. 53, n. 9, p. 1267–1276, 2015. Disponível em:

<https://doi.org/10.3109/13880209.2014.974063>. Acesso em: 9 set. 2020.

RIBEIRO, A. P. de O.; GOMES, F. dos S.; MARIA OLBRICH DOS SANTOS, K.; DA MATTA, V. M.; FREITAS DE SÁ, D. de G. C.; SANTIAGO, M. C. P. de A.; CONTE, C.; DE OLIVEIRA COSTA, S. D.; OLIVEIRA RIBEIRO, L. de; DE OLIVEIRA GODOY, R. L.; WALTER, E. H. M. 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, p. 108756, 2020. Disponível em:

<https://doi.org/10.1016/j.lwt.2019.108756>. Acesso em: 9 set. 2020.

RICCIARDI, A.; IANNIELLO, R. G.; PARENTE, E.; ZOTTA, T. Modified chemically defined medium for enhanced respiratory growth of *Lactobacillus casei* and *Lactobacillus plantarum* groups. **Journal of Applied Microbiology**, v. 119, n. 3, p. 776–785, 2015. Disponível em: <https://doi.org/10.1111/jam.12894>. Acesso em: 29 dez. 2020.

ROCHAT, T.; GRATADOUX, J. J.; GRUSS, A.; CORTIER, G.; MAGUIN, E.; LANGELLA, P.; VAN DE GUCHTE, M. Production of a heterologous nonheme catalase by *Lactobacillus casei*: An efficient tool for removal of H₂O₂ and protection of *Lactobacillus bulgaricus* from oxidative stress in milk. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 72, n. 8, p. 5143–5149, 2006. Disponível em:

<https://doi.org/10.1128/AEM.00482-06>. Acesso em: 15 mar. 2021.

RODRIGUES, V. C. da C.; SILVA, L. G. S. da; SIMABUCO, F. M.; VENEMA, K.; ANTUNES, A. E. C. Survival, metabolic status and cellular morphology of probiotics in dairy products and dietary supplement after simulated digestion. **Journal of Functional Foods**, v. 55, p. 126–134, 2019. Disponível em:

<https://doi.org/10.1016/j.jff.2019.01.046>. Acesso em: 9 set. 2020.

RODRÍGUEZ-ROQUE, M. J.; DE ANCOS, B.; SÁNCHEZ-MORENO, C.; CANO, M. P.; ELEZ-MARTÍNEZ, P.; MARTÍN-BELLOSO, O. Impact of food matrix and processing on the in vitro bioaccessibility of vitamin C, phenolic compounds, and hydrophilic antioxidant activity from fruit juice-based beverages. **Journal of Functional Foods**, v. 14, p. 33–43, 2015. Disponível em:

<https://doi.org/10.1016/j.jff.2015.01.020>. Acesso em: 9 set. 2020.

RUIZ SEGURA, L. T.; FIGUEROA PÉREZ, E.; NOWAK-WEGRZYN, A.; SIEPMANN, T.; LARENAS-LINNEMANN, D. Food allergen sensitization patterns in a large allergic population in Mexico. **Allergologia et Immunopathologia**, v. 48, n. 6, p. 553–559, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/J.ALLER.2020.02.004>. Acesso em: 9 set. 2021.

SÁEZ-ORVIZ, S.; PUERTAS, C.; MARCET, I.; RENDUELES, M.; DÍAZ, M. Bioactive synbiotic coatings with lactobionic acid and *Lactobacillus plantarum* CECT 9567 in the production and characterization of a new functional dairy product. **Journal of Functional Foods**, v. 75, p. 104263, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.jff.2020.104263>. Acesso em: 8 mar. 2021.

SALMINEN, S.; COLLADO, M. C.; ENDO, A.; HILL, C.; LEBEER, S.; QUIGLEY, E. M. M.; SANDERS, M. E.; SHAMIR, R.; SWANN, J. R.; SZAJEWSKA, H.; VINDEROLA, G. The International Scientific Association of Probiotics and Prebiotics (ISAPP) consensus statement on the definition and scope of postbiotics. **Nature Reviews Gastroenterology and Hepatology**, v. 18, n. 9, p. 649–667, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/s41575-021-00440-6>. Acesso em: 29 jun. 2021.

SANGOUNI, A. A.; GHAVAMZADEH, S. A review of synbiotic efficacy in non-alcoholic fatty liver disease as a therapeutic approach. **Diabetes and Metabolic Syndrome: Clinical Research and Reviews**, v. 13, n. 5, p. 2917-2922, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.dsx.2019.07.063>. Acesso em: 29 jun. 2021.

SANTOS FILHO, A. L. dos; FREITAS, H. V.; RODRIGUES, S.; ABREU, V. K. G.; LEMOS, T. de O.; GOMES, W. F.; NARAIN, N.; PEREIRA, A. L. F. Production and stability of probiotic cocoa juice with sucralose as sugar substitute during refrigerated storage. **LWT**, v. 99, p. 371–378, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2018.10.007>. Acesso em: 29 jun. 2021.

SARWAR, A.; AZIZ, T.; AL-DALALI, S.; ZHANG, J.; DIN, J. ud; CHEN, C.; CAO, Y.; FATIMA, H.; YANG, Z. Characterization of synbiotic ice cream made with probiotic yeast *Saccharomyces boulardii* CNCM I-745 in combination with inulin. **LWT**, v. 141, p. 110910, 2021. Disponível em:

<https://doi.org/10.1016/j.lwt.2021.110910>. Acesso em: 13 abr. 2022.

SHIOMI, N.; ONODERA, S.; SAKAI, H. Fructo-oligosaccharide content and fructosyltransferase activity during growth of onion bulbs. **New Phytologist**, v. 136, n. 1, p. 105–113, 1997. Disponível em: <https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.1997.tb04736.x>. Acesso em: 13 abr. 2021.

SILVA, P. B.; GARCIA, S.; BALDO, C.; CELLIGOI, M. A. P. C. Prebiotic activity of fructooligosaccharides produced by *Bacillus subtilis* natto CCT 7712. **Acta Alimentaria**, v. 46, n. 2, p. 145–151, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1556/066.2016.0004>. Acesso em: 13 abr. 2021.

SILVA, R. M.; FILHO, E. G. A.; CAMPELO, P. H.; SILVA, F. E. F.; ZAMPIERI, D. S.; GRAMOSA, N. V.; FERNANDES, F. A. N.; RODRIGUES, S. NMR Spectroscopy and Chemometrics to Evaluate the Effect of Different Non-Thermal Plasma Processing on Sapota-do-Solimões (*Quararibea cordata* Vischer) Juice Quality and Composition. **Food and Bioprocess Technology** 2022, v. 1, p. 1–16, 2022. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/S11947-022-02792-6>. Acesso em: 8 mar. 2022.

SINGLETON, V. L.; ROSSI, J. A. Colorimetry of Total Phenolics with Phosphomolybdic-Phosphotungstic Acid Reagents. **American Journal of Enology and Viticulture**, v. 16, n. 3, 1965. Disponível em: <http://www.ajevonline.org/cgi/content/abstract/16/3/144>. Acesso em: 8 mar. 2022.

SKOTT, E.; YANG, L. L.; STIERNBORG, M.; SÖDERSTRÖM, Å.; RÜEGG, J.; SCHALLING, M.; FORSELL, Y.; GIACOBINI, M. B.; LAVEBRATT, C. Effects of a synbiotic on symptoms, and daily functioning in attention deficit hyperactivity disorder – A double-blind randomized controlled trial. **Brain, Behavior, and Immunity**, v. 89, p. 9–19, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.bbi.2020.05.056>. Acesso em: 8 mar. 2022.

ŚLIŻEWSKA, K.; CHLEBICZ-WÓJCIK, A. Growth Kinetics of Probiotic Lactobacillus Strains in the Alternative, Cost-Efficient Semi-Solid Fermentation Medium. **Biology**, v. 9, n. 12, p. 423, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/biology9120423>. Acesso em: 27 fev. 2021.

SOARES, M. B.; MARTINEZ, R. C. R.; PEREIRA, E. P. R.; BALTHAZAR, C. F.;

CRUZ, A. G.; RANADHEERA, C. S.; SANT'ANA, A. S. The resistance of *Bacillus*, *Bifidobacterium*, and *Lactobacillus* strains with claimed probiotic properties in different food matrices exposed to simulated gastrointestinal tract conditions. **Food Research International**, v. 125, p. 108542, 2019. Disponível em:

<https://doi.org/10.1016/j.foodres.2019.108542>. Acesso em: 8 abr. 2022.

SONG, S.; WANG, X.; XU, K.; NING, L.; YANG, X. Rapid identification and quantitation of the viable cells of *Lactobacillus casei* in fermented dairy products using an aptamer-based strategy powered by a novel cell-SELEX protocol. **Journal of Dairy Science**, v. 102, n. 12, p. 10814–10824, 2019. Disponível em:

<https://doi.org/10.3168/jds.2019-16693>. Acesso em: 8 abr. 2022.

SOTO, R. I.; JIMÉNEZ-MUNGUÍA, M. T.; MANI-LÓPEZ, E.; PALOU, E.; LÓPEZ-MALO, A. Growth and viability of *Lactobacillus acidophilus* NRRL B-4495, *Lactobacillus casei* NRRL B-1922 and *Lactobacillus plantarum* NRRL B-4496 in milk supplemented with cysteine, ascorbic acid and tocopherols. **International Dairy Journal**, v. 97, p. 15–24, 2019. Disponível em:

<https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2019.05.003>. Acesso em: 27 out. 2020.

SOUZA, C. H. B. de; GIOIELLI, L. A.; SAAD, S. M. I. Inulin increases *Bifidobacterium animalis* Bb-12 in vitro gastrointestinal resistance in margarine. **LWT - Food Science and Technology**, v. 79, p. 205–212, 2017. Disponível em:

<https://doi.org/10.1016/j.lwt.2017.01.032>. Acesso em: 8 mar. 2021.

SWANSON, K. S.; GIBSON, G. R.; HUTKINS, R.; REIMER, R. A.; REID, G.; VERBEKE, K.; SCOTT, K. P.; HOLSCHER, H. D.; AZAD, M. B.; DELZENNE, N. M.; SANDERS, M. E. The International Scientific Association for Probiotics and Prebiotics (ISAPP) consensus statement on the definition and scope of synbiotics. **Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology**, v. 17, n. 11, p. 687-701, 2020.

Disponível em: <https://doi.org/10.1038/s41575-020-0344-2>. Acesso em: 21 set. 2020.

TANDON, D.; HAQUE, M. M.; GOTE, M.; JAIN, M.; BHADURI, A.; DUBEY, A. K.; MANDE, S. S. A prospective randomized, double-blind, placebo-controlled, dose-response relationship study to investigate efficacy of fructo-oligosaccharides (FOS) on human gut microflora. **Scientific Reports 2019 9:1**, v. 9, n. 1, p. 1–15, 2019.

Disponível em: <https://doi.org/10.1038/s41598-019-41837-3>. Acesso em: 8 abr. 2022.

TERPOU, A.; BEKATOROU, A.; BOSNEA, L.; KANELLAKI, M.; GANATSIOS, V.; KOUTINAS, A. A. Wheat bran as prebiotic cell immobilisation carrier for industrial functional Feta-type cheese making: Chemical, microbial and sensory evaluation.

Biocatalysis and Agricultural Biotechnology, v. 13, p. 75–83, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.bcab.2017.11.010>. Acesso em: 8 abr. 2022.

THAKUR, N.; RAIGOND, P.; SINGH, Y.; MISHRA, T.; SINGH, B.; LAL, M. K.; DUTT, S. Recent updates on bioaccessibility of phytonutrients. **Trends in Food**

Science and Technology, v. 97, p. 366-380, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2020.01.019>. Acesso em: 8 abr. 2022.

TIAN, X.; WANG, Y.; CHU, J.; MOHSIN, A.; ZHUANG, Y. Exploring cellular fatty acid composition and intracellular metabolites of osmotic-tolerant mutant *Lactobacillus paracasei* NCBIO-M2 for highly efficient lactic acid production with high initial glucose concentration. **Journal of Biotechnology**, v. 286, p. 27–35, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2018.09.005>. Acesso em: 8 abr. 2022.

TSAI, F.-H.; LIEN, J.-C.; LIN, L.-W.; CHEN, H.-Y.; CHING, H.; WU, C.-R.

Protective Effect of *Broussonetia papyrifera* against Hydrogen Peroxide-Induced Oxidative Stress in SH-SY5Y Cells. **Biosci. Biotechnol. Biochem**, v. 73, p. 90080–90081, 2009. Disponível em: <https://doi.org/10.1271/bbb.90080>. Acesso em: 8 abr. 2022.

TULUMOĞLU, S.; ERDEM, B.; SIMŞEK, Ö. The effects of inulin and fructo-oligosaccharide on the probiotic properties of *Lactobacillus* spp. isolated from human milk. **Zeitschrift fur Naturforschung - Section C Journal of Biosciences**, v. 73, n. 9–10, p. 367–373, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1515/znc-2018-0001>. Acesso em: 8 abr. 2022.

VALERO-CASES, E.; CERDÁ-BERNAD, D.; PASTOR, J. J.; FRUTOS, M. J. Non-dairy fermented beverages as potential carriers to ensure probiotics, prebiotics, and bioactive compounds arrival to the gut and their health benefits. **Nutrients**, v. 12, n. 6, p. 1666, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/nu12061666>. Acesso em: 23 nov. 2020.

VALERO-CASES, E.; FRUTOS, M. J. Development of prebiotic nectars and juices as

potential substrates for *Lactobacillus acidophilus*: Special reference to physicochemical characterization and consumer acceptability during storage. **LWT - Food Science and Technology**, v. 81, p. 136–143, 2017. Disponível em:

<https://doi.org/10.1016/j.lwt.2017.03.047>. Acesso em: 23 nov. 2020.

VALERO-CASES, E.; NUNCIO-JÁUREGUI, N.; FRUTOS, M. J. Influence of Fermentation with Different Lactic Acid Bacteria and in Vitro Digestion on the Biotransformation of Phenolic Compounds in Fermented Pomegranate Juices. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 65, n. 31, p. 6488–6496, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.6b04854>. Acesso em: 11 dez. 2020.

VAMANU, E. Effect of gastric and small intestinal digestion on lactic acid bacteria activity in a GIS1 simulator. **Saudi Journal of Biological Sciences**, v. 24, n. 7, p. 1453–1457, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.sjbs.2015.06.028>. Acesso em: 23 nov. 2020.

WANG, J.; XIE, B.; SUN, Z. Quality parameters and bioactive compound bioaccessibility changes in probiotics fermented mango juice using ultraviolet-assisted ultrasonic pre-treatment during cold storage. **LWT**, p. 110438, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2020.110438>. Acesso em: 23 nov. 2020.

WANG, J.; ZHANG, W.; ZHONG, Z.; WEI, A.; BAO, Q.; ZHANG, Y.; SUN, T.; POSTNIKOFF, A.; MENG, H.; ZHANG, H. Gene expression profile of probiotic *Lactobacillus casei* Zhang during the late stage of milk fermentation. **Food Control**, v. 25, n. 1, p. 321–327, 2012. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2011.10.036>. Acesso em: 23 nov. 2020.

WANG; TAO, Y.; ZHANG, X.; SHAO, S.; HAN, Y.; CHU, D. T.; XIE, G.; YE, X. Metabolic profile of ginkgo kernel juice fermented with lactic acid bacteria: A potential way to degrade ginkgolic acids and enrich terpene lactones and phenolics. **Process Biochemistry**, v. 76, p. 25–33, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2018.11.006>. Acesso em: 23 nov. 2020.

WANG, X. *et al.* Gut Microbiota Variation With Short-Term Intake of Ginger Juice on Human Health. **Frontiers in Microbiology**, v. 11, p. 2453, 2021 a. Disponível em: <https://doi.org/10.3389/FMICB.2020.576061/BIBTEX>. Acesso em: 23 nov. 2020.

WANG, X.; HAN, M.; ZHANG, M.; WANG, Y.; REN, Y.; YUE, T.; GAO, Z. In vitro evaluation of the hypoglycemic properties of lactic acid bacteria and its fermentation adaptability in apple juice. **LWT**, v. 136, p. 110363, 2021 b. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2020.110363>. Acesso em: 19 out. 2020.

WEN, J.; MA, L.; XU, Y.; WU, J.; YU, Y.; PENG, J.; TANG, D.; ZOU, B.; LI, L. Effects of probiotic litchi juice on immunomodulatory function and gut microbiota in mice. **Food Research International**, v. 137, p. 109433, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2020.109433>. Acesso em: 23 nov. 2020.

WRÓBLEWSKA, B.; MARKIEWICZ, L. H.; SZYC, A. M.; DIETRICH, M. A.; SZYMKIEWICZ, A.; FOTSCHKI, J. Lactobacillus casei LcY decreases milk protein immunoreactivity of fermented buttermilk but also contains IgE-reactive proteins. **Food Research International**, v. 83, p. 95–101, 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2016.02.016>. Acesso em: 23 nov. 2020.

XIONG, T.; LI, X.; GUAN, Q.; PENG, F.; XIE, M. Starter culture fermentation of Chinese sauerkraut: Growth, acidification and metabolic analyses. **Food Control**, v. 41, n. 1, p. 122–127, 2014. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2013.12.033>. Acesso em: 23 nov. 2020.

XIONG, Z. Q.; WANG, Q. H.; KONG, L. H.; SONG, X.; WANG, G. Q.; XIA, Y. J.; ZHANG, H.; SUN, Y.; AI, L. Z. Short communication: Improving the activity of bile salt hydrolases in Lactobacillus casei based on in silico molecular docking and heterologous expression. **Journal of Dairy Science**, v. 100, n. 2, p. 975–980, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.3168/jds.2016-11720>. Acesso em: 23 nov. 2020.

YEUM, K.-J.; RUSSELL, R. M. CAROTENOID BIOAVAILABILITY AND BIOCONVERSION. **Annu. Rev. Nutr**, v. 22, p. 483–504, 2002. Disponível em: <https://doi.org/10.1146/annurev.nutr.22.010402.102834>. Acesso em: 4 fev. 2020.

YIN, X.; YAN, Y.; KIM, E. B.; LEE, B.; MARCO, M. L. Short communication: Effect of milk and milk containing Lactobacillus casei on the intestinal microbiota of mice. **Journal of Dairy Science**, v. 97, n. 4, p. 2049–2055, 2014. Disponível em: <https://doi.org/10.3168/jds.2013-7477>. Acesso em: 23 nov. 2020.

YUASA, M.; SHIMADA, A.; MATSUZAKI, A.; EGUCHI, A.; TOMINAGA, M.

Chemical composition and sensory properties of fermented citrus juice using probiotic lactic acid bacteria. **Food Bioscience**, p. 100810, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.fbio.2020.100810>. Acesso em: 24 nov. 2020.

ZEPEDA-HERNÁNDEZ, A.; EDUARDO GARCIA-AMEZQUITA, L.; REQUENA, T.; GARCÍA-CAYUELA, T. Probiotics, prebiotics, and synbiotics added to dairy products: Uses and applications to manage type 2 diabetes. **Food Research International**, v. 142, p. 110208, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2021.110208>. Acesso em: 23 nov. 2020.

ZHANG, Y.; MENG, L.; AI, M.; QIAO, Y.; LIU, G.; FAN, X.; LV, X.; FENG, Z. Nutrient requirements of *Lactobacillus casei* Shirota and their application in fermented milk. **LWT**, v. 118, p. 108735, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2019.108735>. Acesso em: 23 nov. 2020.

ZHAO, C.; WU, Y.; LIU, X.; LIU, B.; CAO, H.; YU, H.; SARKER, S. D.; NAHAR, L.; XIAO, J. Functional properties, structural studies and chemo-enzymatic synthesis of oligosaccharides. **Trends in Food Science and Technology**, v. 66, p. 135–145, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2017.06.008>. Acesso em: 23 nov. 2020.

ZHENG, J. *et al.* A taxonomic note on the genus *Lactobacillus*: Description of 23 novel genera, emended description of the genus *Lactobacillus* Beijerinck 1901, and union of *Lactobacillaceae* and *Leuconostocaceae*. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 70, n. 4, p. 2782–2858, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1099/ijsem.0.004107>. Acesso em: 27 ago. 2021.

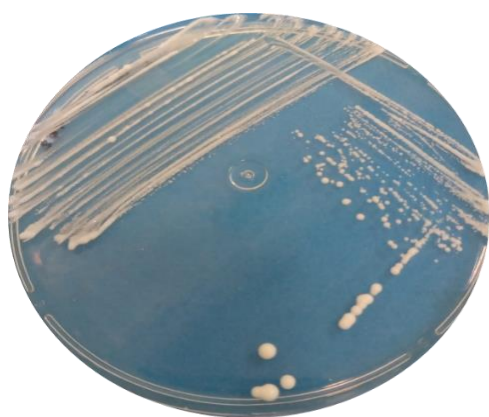
ZHU, Y.; LI, C.; CUI, H.; LIN, L. Feasibility of cold plasma for the control of biofilms in food industry. **Trends in Food Science and Technology**, v. 99, p. 142-151, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2020.03.001>. Acesso em: 23 nov. 2021.

APÊNDICE A - Avaliação da contagem de viáveis em suco de sapota-do-Solimões *in natura*

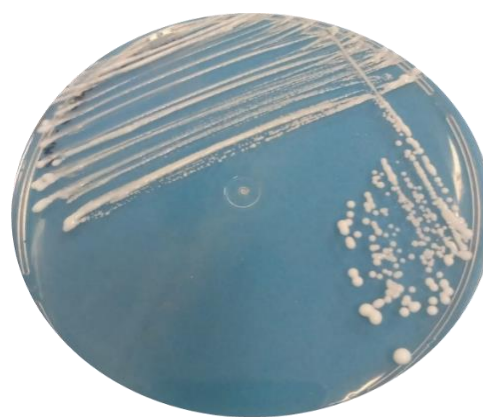
Um teste adicional foi feito para verificar se o suco de sapota-do-Solimões, sem nenhum processamento térmico, apresentava contagem de bactérias com características semelhantes ao *L. casei* B-442. Com isso, uma alíquota da polpa do suco descongelada foi diluída para a análise viabilidade com a técnica de microgota. O mesmo foi feito com o microrganismo em caldo MRS e o suco contendo *L. casei* B-442. O suco de sapota-do-Solimões não apresentou contagem de viáveis em placas de ágar MRS.

Para a caracterização fenotípica, foi feito um repique pela técnica do esgotamento a partir das colônias presentes nas placas com apenas *L. casei* B-442 e *L. casei* B-442 inoculado no suco de sapota-do-Solimões. Após o crescimento durante 24h, as placas apresentaram as mesmas características fenotípicas com colônias brancas e aspecto seco.

Figura 18 – Placas com colônias de *Lacticaseibacillus casei* B-442 fermentado em caldo MRS e em suco de sapota-do-Solimões *in natura*



Lacticaseibacillus casei B-442



Inóculo de *Lacticaseibacillus casei* B-442 no suco de sapota-do-Solimões

APÊNDICE B - Termo de consentimento livre e esclarecido para estudo da microbiota intestinal

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO (TCLE)

Você está sendo convidado como participante da pesquisa intitulada “Efeito do processamento de sucos de frutas funcionais na composição e bioatividade da microbiota intestinal”. Você não deve participar contra a sua vontade. Leia atentamente as informações abaixo e faça qualquer pergunta que desejar, para que todos os procedimentos desta pesquisa sejam esclarecidos.

A presente pesquisa envolve o uso de fezes humanas para o estudo dos efeitos de diferentes processamentos e nutrientes na composição da microbiota intestinal. O participante será convidado a realizar a coleta das fezes de forma higiênica em local reservado e em recipiente apropriado para a coleta desse tipo de material. O material coletado será utilizado em ensaios de fermentação e em seguida as amostras serão submetidas a identificação dos micro-organismos presentes através de métodos adequados.

Os pesquisadores se comprometem em utilizar os dados e/ou material coletado somente para esta pesquisa.

Os doadores não receberão **NENHUM PAGAMENTO POR PARTICIPAR DA PESQUISA.**

A qualquer momento o participante poderá recusar a continuar participando da pesquisa e também poderá retirar o seu consentimento, sem que isso lhe traga qualquer prejuízo.

As informações conseguidas através da sua participação não permitirão a identificação da sua pessoa, exceto aos responsáveis pela pesquisa, e a divulgação das mencionadas informações só será feita entre os profissionais estudiosos do assunto.

Endereço da responsável pela pesquisa:

Nome: Sueli Rodrigues

Instituição: Universidade Federal do Ceará

Endereço: Av. Mister Hull, s/n, Campus do Pici, Bloco 851, Dept. de Engenharia de Alimentos, Laboratório de Biotecnologia

Telefones para contato: 85 33669656

ATENÇÃO: Se você tiver alguma consideração ou dúvida, sobre a sua participação na pesquisa, entre em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa da UFC/PROPESQ – Rua Coronel Nunes de Melo, 1000 - Rodolfo Teófilo, fone: 3366-8344/46. (Horário: 08:00-12:00 horas de segunda a sexta-feira).

O CEP/UFC/PROPESQ é a instância da Universidade Federal do Ceará responsável pela avaliação e acompanhamento dos aspectos éticos de todas as pesquisas envolvendo seres humanos.

O abaixo assinado _____, ____anos, RG: _____, declara que é de livre e espontânea vontade que está como participante de uma pesquisa. Eu declaro que li cuidadosamente este Termo de Consentimento Livre e Esclarecido e que, após sua leitura, tive a oportunidade de fazer perguntas sobre o seu conteúdo, como também sobre a pesquisa, e recebi explicações que responderam por completo minhas dúvidas. E declaro, ainda, estar recebendo uma via assinada deste termo.

Fortaleza, ____/____/____

Nome do participante da pesquisa	Data	Assinatura
Nome do pesquisador Sueli Rodrigues	Data	Assinatura
Nome do aplicador do TCLE Thatyane Vidal Fonteles	Data	Assinatura

APÊNDICE C - Projeto para prorrogação da bolsa de doutorado FUNCAP-CE

Solicitação de Prorrogação de Bolsa FUNCAP em Virtude da pandemia de COVID-19

Suco de sapota-do-Solimões (*Quararibea cordata* Vischer) como meio para consumo do probiótico *L. casei* B-442

Justificativa

O plano de trabalho a seguir tem como objetivo justificar a necessidade de prorrogação da bolsa da aluna Rhonyele Maciel da Silva, que cursa o doutorado do Programa de Pós-graduação em Engenharia Química da Universidade Federal do Ceará - UFC, com bolsa concedida desde março de 2018 pela Fundação Cearense de Apoio ao Desenvolvimento Científico e Tecnológico – FUNCAP, orientada por Sueli Rodrigues.

O projeto de doutorado foi modificado duas vezes durante os 4 anos de bolsa. Primeiramente, devido falta de recurso que impediu de dar continuidade ao projeto de imobilização de enzimas. Felizmente, conseguiu-se publicar um artigo com o trabalho feito entre 2018 e 2019 (DOI: [10.1016/j.ijbiomac.2020.04.077](https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2020.04.077)). O segundo projeto iniciado em 2019.2 foi encerrado devido a recorrente falta de energia no Campus do Pici-UFC o que levou a perda da matéria prima originária do Amazonas e das amostras já processadas. Logo após, veio a pandemia de COVID-19, que tornou qualquer projeto impossível de ser executado de forma presencial.

No entanto, em 2020.2 durante a primeira abertura em regime de revezamento no laboratório de biotecnologia (LABIOTEC-UFC) foi iniciado o projeto: Suco de sapota-do-solimões (*Quararibea cordata* Vischer) como um meio para consumo do probiótico *Lacticaseibacillus casei* B-442. Com isso foi desenvolvido um suco probiótico de sapota-do-solimões fermentado pelo *L. casei* B-442, no qual manteve a viabilidade do micro-organismo durante a digestão simulada *in vitro* e mesmo após 30 dias sob refrigeração. E um suco de sapota-do-solimões simbiótico, ou seja, adicionado de frutooligossacarídeos e fermentado pelo *L. casei* B-442. O suco simbiótico também apresentou resultados expressivos quanto a viabilidade do micro-organismo, principalmente após 30 dias sob refrigeração.

O projeto passou pelo exame de qualificação onde algumas mudanças na redação e nas análises realizadas foram feitas. E para finalizá-lo ficou faltando a avaliação do efeito desses sucos, probiótico e simbiótico, após fermentado por microbiota fecal. Essa análise é crucial na avaliação da efetividade dos sucos como alimento funcional, pois a interação do micro-organismo probiótico e da fibra prebiótica com a microbiota fecal permite avaliar os possíveis efeitos benéficos a saúde que o consumo de tais bebidas traria ao consumidor.

Para isso será necessário mais tempo para a terminar essa parte inovadora do projeto. Pois trata-se de processos fermentativos sendo necessário pelo menos duas semanas para ativar micro-organismo, esterilizar material, preparar reatores para que possa ocorrer o processo de forma inócua. Além disso, uma parceria com o LEMBIOTECH-UFC, permitirá que seja avaliado o perfil genômico das amostras fecais utilizadas. O que enriquece muito a tese de doutorado possibilitando a publicação dos artigos em revista de alto impacto.

A seguir o plano de trabalho (tabela 9) para o período de prorrogação de março a maio de 2022 (3 meses) é apresentado a seguir. Informamos que o estudo com microbiota fecal humana foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da (CEP/UFC) sob número CAAE 51874021.0.0000.5054 em 25/10/2021. O parecer de aprovação pelo CEP está anexado a este plano de trabalho.

Tabela 9 - Plano de trabalho

Período	Local	Atividade de pesquisa
7 a 11 de março de 2022	LABIOTEC-UFC	Preparo de meio de cultura para ativação do micro-organismo (<i>L. casei</i> B-442) e contagem de viáveis. Produção do suco probiótico de sapota-do-Solimões para digestão <i>in vitro</i> com microbiota fecal (1 e 30 dias sob refrigeração).
14 a 18 de março de 2022	LABIOTEC-UFC	Preparo de meio de cultura para contagem de viáveis.

		<p>Preparo de soluções para simulação de digestão <i>in vitro</i> com amostra de microbiota fecal.</p> <p>Digestão <i>in vitro</i> com microbiota fecal do suco probiótico de sapota-do-solimões (1 dia sob refrigeração).</p> <p>Extração do DNA do suco probiótico após fermentado por microbiota fecal de 0 e 48 h.</p>
21 a 24 de março de 2022	LABIOTEC-UFC	<p>Preparo de meio de cultura para ativação do micro-organismo (<i>L. casei</i> B-442) e contagem de viáveis.</p> <p>Produção do suco simbiótico de sapota-do-solimões para digestão <i>in vitro</i> com microbiota fecal (1 e 30 dias sob refrigeração).</p>
28 a 31 de março de 2022	LABIOTEC-UFC	<p>Preparo de meio de cultura para contagem de viáveis.</p> <p>Preparo de soluções para simulação de digestão <i>in vitro</i> com amostra de microbiota fecal.</p> <p>Digestão <i>in vitro</i> com microbiota fecal do suco simbiótico de sapota-do-Solimões (1 dia sob refrigeração).</p> <p>Extração do DNA do suco simbiótico após fermentado por microbiota fecal de 0 e 48 h.</p>
4 a 8 de abril de 2022	LEMBIOTECH-UFC-	<p>Análise da microbiota fecal a partir da extração do DNA metagenômico das amostras fermentadas de 0 e 48 h.</p>
11 a 14 de abril de 2022	LABIOTEC-UFC	<p>Preparo de meio de cultura para contagem de viáveis.</p> <p>Preparo de soluções para simulação de digestão <i>in vitro</i> com amostra de microbiota fecal. Digestão <i>in vitro</i> suco probiótico de</p>

		<p>sapota-do-solimões após 30 dias sob refrigeração.</p> <p>Extração do DNA do suco probiótico após fermentado por microbiota fecal de 0 e 48 h.</p>
18 a 20 de abril de 2022	LABIOTEC-UFC	Análise de açúcares e ácidos graxos de cadeia curta por HPLC.
25 a 29 de abril de 2022	LABIOTEC-UFC	<p>Preparo de meio de cultura para contagem de viáveis.</p> <p>Preparo de soluções para simulação de digestão <i>in vitro</i> com amostra de microbiota fecal.</p> <p>Digestão <i>in vitro</i> suco simbiótico de sapota-do-solimões após 30 dias sob refrigeração.</p> <p>Extração do DNA do suco simbiótico após fermentado por microbiota fecal de 0 e 48 h.</p>
02 a 06 de maio de 2022	LABIOTEC-UFC	Análise de açúcares e ácidos graxos de cadeia curta por HPLC.
09 a 13 de maio de 2022	LEMBIOTECH-UFC	Análise da microbiota fecal a partir da extração do DNA metagenômico das amostras fermentadas de 0 e 48 h.
16 a 20 de maio de 2022	LABIOTEC-UFC	<p>Avaliação dos frutooligossacarídeos do suco simbiótico (1 dia sob refrigeração) por cromatografia de camada delgada.</p> <p>Quantificação dos frutooligossacarídeos por densitometria.</p>
23 a 27 de maio de 2022	LABIOTEC-UFC	<p>Avaliação dos frutooligossacarídeos do suco simbiótico (30 dias sob refrigeração) por cromatografia de camada delgada.</p> <p>Quantificação dos frutooligossacarídeos por densitometria.</p>
01 de abril a 30 de maio de 2022	LABIOTE-UFC	Redação da versão final da tese e artigo científicos. A redação da tese e a confecção do artigo científico será realizada

		simultaneamente a realização dos experimentos sendo os dados tratados e incorporados a tese tão logo estejam disponíveis.
Junho de 2022	PGEQ	Defesa da tese de doutorado.

Fonte: Elaborada pela autora.