



UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS

DEPARTAMENTO DE ENGENHARIA DE ALIMENTOS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE
ALIMENTOS

CRISTIANO SILVA DO NASCIMENTO

OBTENÇÃO DE SUCOS DE FRUTAS POTENCIALMENTE PÓS-BIÓTICOS POR
TERMOSSONICAÇÃO E PROCESSAMENTO TÉRMICO E SEUS EFEITOS NA
MICROBIOTA INTESTINAL HUMANA

FORTALEZA

2026

CRISTIANO SILVA DO NASCIMENTO

OBTENÇÃO DE SUCOS DE FRUTAS POTENCIALMENTE PÓS-BIÓTICOS POR
TERMOSSONICAÇÃO E PROCESSAMENTO TÉRMICO E SEUS EFEITOS NA
MICROBIOTA INTESTINAL HUMANA

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência e tecnologia de Alimentos da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial à obtenção do título de Doutor em Ciência e Tecnologia de Alimentos. Área de concentração: Ciência e Tecnologia de Alimentos.

Orientadora: Profa. Dra. Sueli Rodrigues

FORTALEZA

2026

CRISTIANO SILVA DO NASCIMENTO

OBTENÇÃO DE SUCOS DE FRUTAS POTENCIALMENTE PÓS-BIÓTICOS POR
TERMOSSONICAÇÃO E PROCESSAMENTO TÉRMICO E SEUS EFEITOS NA
MICROBIOTA INTESTINAL HUMANA

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência e tecnologia de Alimentos da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial à obtenção do título de Doutor em Ciência e Tecnologia de Alimentos. Área de concentração: Ciência e Tecnologia de Alimentos.

Aprovada em: 31/03/2026.

BANCA EXAMINADORA:

Profa. Dra. Sueli Rodrigues (Orientadora)
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Dra. Glenise Bierhalz Voss
Empresa Duas Rodas

Profa. Dra. Eliane Setsuko Kamimura
Universidade de São Paulo (USP)

Dra. Ana Karoline Ferreira Leite
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Prof. Dr. Marciane Magnani
Universidade Estadual da Paraíba (UEPB)

À minha mãe,
Pois tudo que sou devo a você.
(in Memoriam)

AGRADECIMENTOS

À minha amada mãe, por sempre acreditar em mim e por tornar esse sonho possível. Tudo que sou devo a você, e nos meus atos, palavras e pensamentos, sua memória está viva. Todos os dias penso em você, com saudade e amor.

À minha tia Luciana, por ser um exemplo de dedicação e esforço. Você é parte essencial dessa conquista.

À minha família, por todo amor e carinho. Em especial, aos meus queridos primos/irmãos, Larissa, Letícia e Gabriel.

À professora Sueli Rodrigues, pela orientação, dedicação, paciência e por sempre estar à disposição para ajudar na minha caminhada científica. Obrigado pelo acolhimento durante todos esses anos.

À Profa. Dra. Filipa Vinagre, pela oportunidade de realizar este intercâmbio sob sua supervisão. Agradeço por me receber tão bem e por compartilhar seu conhecimento, tornando esta experiência inesquecível e muito produtiva. Agradeço também à Universidade de Lisboa.

Aos membros da banca examinadora, Dra. Ana Karoline Ferreira Leite, Profa. Dra. Eliane Setsuko Kamimura, Dra. Glenise Bierhalz Voss e Profa. Dra. Marciane Magnani.

À equipe do Labiotec, por todos os momentos de descontração, risadas, pelo apoio, conselhos, amizade e ajuda nos momentos de total desespero.

À Rhony, por todo o companheirismo durante todos esses anos, pelas risadas, memes, shows e por sofrer junto comigo.

Aos meus amigos de turma do doutorado, por todo o companheirismo.

O presente trabalho foi realizado com o apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES). Agradeço ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), à Fundação Cearense de Apoio ao Desenvolvimento Científico e Tecnológico (FUNCAP) e ao Instituto Nacional de Frutos Tropicais (INCT-FT) pelo apoio financeiro.

Agradeço também à Universidade Federal do Ceará pela formação durante esses anos.

“Long story short, I survived.”

– Taylor Swift

RESUMO

A transição de probióticos para pós-bióticos tem se destacado na busca por alimentos funcionais mais estáveis. Este trabalho teve como objetivo desenvolver, modelar cinéticas de inativação e avaliar as assinaturas funcionais de bebidas pós-bióticas à base de frutas fermentadas por *Lactocaseibacillus casei* NRRL B-442, comparando a eficácia do processamento térmico (TH) e da termossonicação (TS). A metodologia englobou a fermentação láctica de suco de acerola e de laranja, posteriormente submetidos à inativação térmica (TH, a 80 °C) e termossonica (TS, a 60 °C). Avaliaram-se a estabilidade físico-química, a viabilidade celular, o potencial antibacteriano e a cinética de inativação sob diferentes geometrias de reator, além da modulação da microbiota intestinal humana por meio de fermentação colônica anaeróbica. Os resultados indicaram que tanto a TS quanto o TH inativaram efetivamente o probiótico, preservando os compostos fenólicos, a atividade antibacteriana e a capacidade antioxidante ao longo de 35 dias sob armazenamento refrigerado (4 °C). A modelagem cinética sugeriu que o processamento térmico seguiu uma cinética linear, enquanto a eficiência da TS dependeu da geometria do reator. O uso de reatores de vidro maiores (capacidade de 250 mL) parece ter otimizado o fluxo acústico, propiciando uma inativação linear e mais rápida que o método térmico, ao passo que reatores de aço confinados (10 mL) geraram um efeito de cauda resistente. Durante a fermentação colônica, observou-se que o método de inativação influenciou o comportamento da matriz. O processamento TH-80 gerou um pós-biótico butirogênico, possivelmente associado à supressão do filo *Proteobacteria* e ao enriquecimento de gêneros de interesse (*Bacteroides* e *Phascolarctobacterium*). Em contrapartida, o suco TS-60 favoreceu a expansão do gênero *Fusobacterium*, levantando a hipótese de que a lise celular mediada pela cavitação possa ter tornado compostos intracelulares mais disponíveis para microrganismos oportunistas. Os achados sugerem que o processamento térmico atua como uma estratégia promissora para o desenvolvimento de pós-bióticos com potencial para auxiliar na mitigação da disbiose colônica. A termossonicação constitui uma tecnologia rápida, desde que a geometria do reator garanta condições acústicas adequadas; contudo, as alterações promovidas na matriz exigem estudos em condições *in vivo*.

Palavras-chave: Fermentação láctica; Ultrassom; Pasteurização térmica; Modelagem cinética; Modulação da microbiota intestinal.

ABSTRACT

The transition from probiotics to postbiotics has gained prominence in the search for more stable functional foods. This study aimed to develop, model inactivation kinetics, and evaluate the functional signatures of postbiotic fruit-based beverages fermented by *Lactocaseibacillus casei* NRRL B-442, comparing the efficacy of thermal processing (TH) and thermosonication (TS). The methodology encompassed the lactic acid fermentation of acerola and orange juices, which were subsequently subjected to thermal (TH, at 80 °C) and thermosonic (TS, at 60 °C) inactivation. Physicochemical stability, cell viability, antibacterial potential, and inactivation kinetics under different reactor geometries were evaluated, along with the modulation of the human gut microbiota through anaerobic colonic fermentation. The results indicated that both TS and TH effectively inactivated the probiotic, preserving phenolic compounds, antibacterial activity, and antioxidant capacity over 35 days under refrigerated storage (4 °C). Kinetic modeling suggested that thermal processing followed linear kinetics, while TS efficiency depended on the reactor geometry. The use of larger glass reactors (250 mL capacity) seems to have optimized the acoustic flow, providing a linear and faster inactivation than the thermal method, whereas confined steel reactors (10 mL) generated a resistant tailing effect. During colonic fermentation, it was observed that the inactivation method influenced the matrix behavior. The TH-80 processing generated a butyrogenic postbiotic, possibly associated with the suppression of the *Proteobacteria* phylum and the enrichment of genera of interest (*Bacteroides* and *Phascolarctobacterium*). Conversely, the TS-60 juice favored the expansion of the *Fusobacterium* genus, raising the hypothesis that cavitation-mediated cell lysis may have made intracellular compounds more available to opportunistic microorganisms. The findings suggest that thermal processing acts as a promising strategy for developing postbiotics with the potential to assist in mitigating colonic dysbiosis. Thermosonication constitutes a rapid technology, provided that the reactor geometry ensures adequate acoustic conditions; however, the alterations promoted in the matrix require studies under *in vivo* conditions.

Keywords: Lactic acid fermentation; Ultrasound; Thermal pasteurization; Kinetic modeling; Gut microbiota modulation.

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO GERAL	11
2	FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA	13
2.1	Transformando sucos de frutas em bebidas probióticas	13
2.2	Probióticos a pós-bióticos: Obtenção via termossonicação e processamento térmico.....	18
2.2.1	<i>Termossonicação.....</i>	<i>20</i>
2.2.2	<i>Processamento térmico.....</i>	<i>24</i>
2.2.3	<i>Modelagem cinética da inativação microbiana.....</i>	<i>27</i>
2.3	Pós-bióticos: definição, composição bioativa e mecanismos funcionais.....	28
2.4	Hipótese científica e estrutura da tese.....	32
3	OBTENÇÃO DE SUCOS DE ACEROLA POTENCIALMENTE PÓS-BIÓTICOS POR TERMOSSONICAÇÃO E PROCESSAMENTO TÉRMICO.....	34
3.1	Introdução.....	35
3.2	Materiais e métodos.....	37
3.2.1	<i>Preparo do suco.....</i>	<i>37</i>
3.2.2	<i>Preparo e enumeração do <i>Lactocaseibacillus casei</i>.....</i>	<i>37</i>
3.2.3	<i>Fermentação do suco de acerola</i>	<i>37</i>
3.2.4	<i>Termossonicação (TS).....</i>	<i>38</i>
3.2.5	<i>Processamento térmico (TH).....</i>	<i>38</i>
3.2.6	<i>Estabilidade durante o armazenamento frio.....</i>	<i>39</i>
3.2.7	<i>Determinação de açúcares e ácidos orgânicos.....</i>	<i>39</i>
3.2.8	<i>Compostos fenólicos totais.....</i>	<i>40</i>
3.2.9	<i>Atividade antioxidante.....</i>	<i>40</i>
3.2.10	<i>Qualidade microbiológica.....</i>	<i>41</i>
3.2.11	<i>Ensaio de atividade antibacteriana.....</i>	<i>41</i>
3.2.12	<i>Análise estatística.....</i>	<i>42</i>
3.3	Resultados e discussão.....	42
3.3.1	<i>Fermentação do suco de acerola por <i>L. casei</i>.....</i>	<i>42</i>
3.3.2	<i>Estabilidade do probiótico durante o armazenamento refrigerado.....</i>	<i>45</i>

3.3.3	<i>Produção de pós-bióticos por termossonicação (TS) e processamento térmico (TH).....</i>	48
3.3.4	<i>Estabilidade do pós-biótico durante o armazenamento refrigerado.....</i>	51
3.3.5	<i>Atividade antibacteriana.....</i>	54
3.4	Conclusão.....	58
4	TIPO DE REATOR IMPACTA A CINÉTICA DE INATIVAÇÃO POR TERMOSSONICAÇÃO DE <i>LACTICASEIBACILLUS CASEI</i> EM BEBIDA POTENCIALMENTE PÓS-BIÓTICA DE LARANJA.....	60
4.1	Introdução.....	61
4.2	Materiais e métodos.....	63
4.2.1	<i>Suco de laranja.....</i>	63
4.2.2	<i>Preparo e enumeração do <i>Lacticaseibacillus casei</i>.....</i>	64
4.2.3	<i>Fermentação do néctar de laranja</i>	64
4.2.4	<i>Experimentos de inativação térmica.....</i>	65
4.2.5	<i>Experimentos de inativação por termossonicação.....</i>	65
4.2.6	<i>Modelagem matemática.....</i>	68
4.2.6.1	<i>Modelo de Bigelow.....</i>	68
4.2.6.2	<i>Modelo de Weibull.....</i>	69
4.2.7	<i>Avaliação do modelo e estatística.....</i>	69
4.3	Resultados e discussão.....	70
4.3.1	<i>Cinética de inativação térmica.....</i>	70
4.3.2	<i>Efeito da temperatura na cinética de inativação microbiana por TS (10 W/mL): Câmara confinada de aço inoxidável (Reator I, 10 mL)</i>	73
4.3.3	<i>Efeito da temperatura na cinética de inativação microbiana por TS (10 W/mL): Reator de vidro (Reator II, 100 mL)</i>	76
4.3.4	<i>Comparação entre termossonicação a 10 W/mL e inativação térmica de <i>Lacticaseibacillus casei</i> a diferentes temperaturas (reatores I e II)</i>	79
4.3.5	<i>Comparação da termossonicação a 3 W/mL (Reatores I e III) e inativação térmica.....</i>	83
4.3.6	<i>Condições recomendadas para a produção de bebida pós-biótica com base na cinética em escala de laboratório.....</i>	86
4.4	Conclusão.....	87

5	SUCOS DE ACEROLA POTENCIAMENTE PÓS-BIÓTICOS OBTIDOS POR PROCESSAMENTO TÉRMICO E TERMOSSONICAÇÃO: EFEITOS NA ASSINATURA ECOLÓGICA <i>IN VITRO</i> DA MICROBIOTA INTESTINAL HUMANA.....	89
5.1	Introdução.....	90
5.2	Materiais e métodos.....	91
5.2.1	<i>Preparo do suco.....</i>	<i>91</i>
5.2.2	<i>Preparo e enumeração do <i>Lactocaseibacillus casei</i>.....</i>	<i>92</i>
5.2.3	<i>Fermentação do suco de acerola.....</i>	<i>92</i>
5.2.4	<i>Termossonicação (TS).....</i>	<i>92</i>
5.2.5	<i>Processamento térmico (TH).....</i>	<i>93</i>
5.2.6	<i>Digestão in vitro.....</i>	<i>93</i>
5.2.7	<i>Inóculo fecal.....</i>	<i>94</i>
5.2.8	<i>Fermentação colônica in vitro.....</i>	<i>95</i>
5.2.9	<i>Análise da microbiota fecal.....</i>	<i>95</i>
5.2.10	<i>Determinação de açúcares e ácidos orgânicos.....</i>	<i>96</i>
5.2.11	<i>Compostos fenólicos totais.....</i>	<i>96</i>
5.2.12	<i>Análise estatística.....</i>	<i>96</i>
5.3	Resultados e discussão.....	97
5.3.1	<i>Estabilidade durante a digestão in vitro.....</i>	<i>97</i>
5.3.2	<i>Perfil metabólico durante a fermentação colônica.....</i>	<i>99</i>
5.3.3	<i>Influência do método de inativação na microbiota colônica.....</i>	<i>103</i>
5.3.4	<i>Táxons discriminantes e análise multivariada.....</i>	<i>109</i>
5.4	Conclusão.....	114
6	CONCLUSÃO GERAL.....	115
	REFERÊNCIAS.....	117

1 INTRODUÇÃO GERAL

A eficácia dos produtos alimentícios probióticos tem sido tradicionalmente atrelada à exigência de um elevado número de células viáveis e ativas no momento do consumo (Terpou *et al.*, 2019). No entanto, a manutenção dessa viabilidade representa um desafio tecnológico significativo, especialmente em matrizes não lácteas, devido a estressores ambientais e condições de armazenamento. Diante dessa limitação, emergiu os pós-bióticos que são definidos como preparações de microrganismos inanimados e/ou os seus componentes celulares que conferem benefícios à saúde do hospedeiro (Salminen *et al.*, 2021). Além de eliminarem os riscos associados à translocação bacteriana e à transferência de genes de resistência (Beegum; Chandran, 2024; Homayouni Rad *et al.*, 2020), os pós-bióticos oferecem uma estabilidade superior e maior facilidade de incorporação em matrizes alimentares complexas, como os sucos e néctares de frutas (Aguilar-Toalá *et al.*, 2018; Barros *et al.*, 2020).

O suco de acerola (*Malpighia emarginata*) destaca-se como um veículo promissor para o desenvolvimento de bebidas funcionais devido ao seu excepcional teor de vitamina C e compostos fenólicos (Prakash; Baskaran, 2018). A sua fermentação por bactérias lácticas, como o *Lactobacillus casei*, não apenas enriquece a matriz com metabólitos antimicrobianos e antioxidantes, mas também melhora a bioacessibilidade de compostos bioativos ligados à parede celular vegetal (Leonard *et al.*, 2021; Muhialdin *et al.*, 2021). Contudo, para a obtenção de uma bebida pós-biótica estável, a inativação celular completa é um pré-requisito obrigatório. O método de inativação atua como uma operação unitária crítica, influenciando diretamente a composição, a integridade e a funcionalidade dos compostos pós-bióticos resultantes (Aggarwal *et al.*, 2022; Pimentel *et al.*, 2023).

O processamento térmico (TH) tem sido a tecnologia padrão empregada na indústria de alimentos para assegurar a inativação microbiana (Aghajanzadeh *et al.*, 2023). Embora eficaz, o emprego de altas temperaturas pode resultar na degradação de compostos sensíveis ao calor e na desnaturação de proteínas, alterando o perfil nutricional e sensorial do produto (Jafarpour, 2022; Wibowo *et al.*, 2025). Como alternativa não térmica e ecologicamente correta, o ultrassom de alta intensidade tem sido amplamente investigado (Fonteles *et al.*, 2024; Hashemi *et al.*, 2023). A combinação do ultrassom com tratamentos térmicos brandos, conhecida como termossonicação (TS), surge como uma estratégia sinérgica capaz de promover a rápida inativação celular via cavitação acústica

e dano mecânico, mitigando os efeitos deletérios da exposição térmica prolongada (Abdulstar *et al.*, 2023; Nunes *et al.*, 2022; Oliveira *et al.*, 2022).

Apesar do potencial da termossonicação, a literatura aponta que a cinética de inativação pode variar drasticamente dependendo da geometria do reator e das propriedades acústicas do material. A interação entre as ondas acústicas e as fronteiras do reator determina o grau de homogeneidade do tratamento (Chakraborty *et al.*, 2024; Kewalramani *et al.*, 2023). A formação de ondas estacionárias em espaços confinados ou a promoção de correntes acústicas (*acoustic streaming*) em volumes maiores altera a distribuição da cavitação, resultando, por vezes, em comportamentos não lineares (efeito de cauda) que comprometem a previsibilidade do ganho de escala industrial ou *scale-up* (Gogate *et al.*, 2001; Mason; Lorimer, 2003).

Para além dos desafios tecnológicos, o impacto dos métodos de inativação nas propriedades biológicas dos pós-bióticos tem sido alvo de investigações recentes. Estudos sugerem que essas tecnologias atuam de maneira distinta na modificação da matriz alimentar (Pimentel *et al.*, 2023). Do ponto de vista do processamento, o tratamento térmico promove a desnaturação proteica, a liberação de açúcares da parede celular e a formação de complexos proteína-fenólicos (Jakobek, 2015; Piqué *et al.*, 2019). Em contrapartida, a cavitação acústica induzida pela termossonicação pode extrair peptídeos intracelulares de baixo peso molecular (Zhao *et al.*, 2024), alterando o perfil e a disponibilidade de nutrientes, como o nitrogênio, na bebida.

No que diz respeito à modulação intestinal, essas diferentes reestruturações físico-químicas determinam como os compostos serão metabolizados no cólon. Compreender como as matrizes geradas por cada processamento influenciam a microbiota humana – afetando a sucessão ecológica e as redes de alimentação cruzada (*cross-feeding*), como aquelas envolvendo o metabolismo de succinato (Ikeyama *et al.*, 2020) – é fundamental para o delineamento de intervenções dietéticas mais seguras e direcionadas.

Diante deste contexto, a presente tese de doutoramento foi estruturada para investigar a viabilidade tecnológica, a cinética de processo e a funcionalidade biológica de sucos de frutas pós-bióticos fermentados por *L. casei* NRRL B-442, comparando sistematicamente o processamento térmico e a termossonicação.

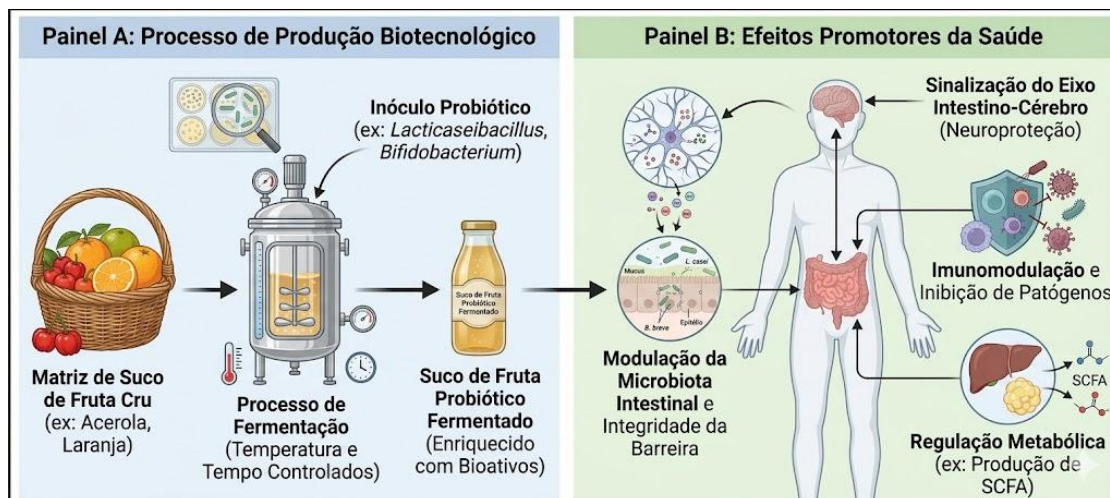
2 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

2.1 Transformando sucos de frutas em bebidas probióticas

A crescente demanda por alimentos e bebidas que promovam a saúde intestinal impulsionou a popularização de sucos de frutas fermentados, com ênfase nos sucos probióticos (ADEBAYO-TAYO *et al.*, 2021; NASEEM *et al.*, 2023). Esses sucos, enriquecidos com microrganismos benéficos, têm se destacado como uma alternativa funcional para o fortalecimento do sistema digestivo e para a promoção do equilíbrio da microbiota intestinal (LEONARD *et al.*, 2022; WU *et al.*, 2021).

A fermentação, um processo biotecnológico ancestral, tem sido utilizada para a preservação de alimentos e bebidas há milênios; contudo, nas últimas décadas, ganhou destaque por seus benefícios à saúde, especialmente no contexto da microbiota intestinal (HASSAN *et al.*, 2021; SHARMA *et al.*, 2020). A fermentação focada em probióticos – microrganismos vivos que, quando consumidos em quantidades adequadas, conferem benefícios à saúde do hospedeiro – representa um avanço significativo na nutrição funcional (TERPOU *et al.*, 2019). Diferentemente da fermentação convencional, que visa principalmente a conservação e o desenvolvimento de sabor e textura, a fermentação probiótica foca na produção de microrganismos benéficos ao hospedeiro, além de compostos bioativos que podem influenciar positivamente a saúde digestiva, imunológica e metabólica (ROSELLI *et al.*, 2021). A Figura 1 apresenta o diagrama esquemático da produção biotecnológica de sucos de frutas probióticos e seus benefícios sistêmicos associados.

Figura 1 - Diagrama esquemático da produção biotecnológica de sucos de frutas probióticos e seus benefícios sistêmicos associados.



Nota: (A) Etapas do processo de fermentação, incluindo a inoculação de cepas probióticas (ex.: *Lactobacillus*, *Bifidobacterium*) na matriz do suco sob condições controladas. (B) Mecanismos de promoção da saúde do hospedeiro, destacando a modulação da microbiota intestinal, imunomodulação, regulação metabólica e sinalização do eixo intestino-cérebro.

Fonte: elaborada pelo autor com auxílio da ferramenta de inteligência artificial Gemini (2026).

O consumo regular de probióticos proporciona diversos benefícios à saúde. Eles promovem uma digestão saudável ao equilibrar a microbiota intestinal, auxiliando na prevenção e no tratamento de distúrbios como diarreia, constipação e síndrome do intestino irritável, além de prevenirem o crescimento de bactérias patogênicas. Ademais, os probióticos fortalecem o sistema imunológico, estimulando a produção de células de defesa e aumentando a resistência do organismo a infecções (TEGEGNE; KEBEDE, 2022).

Vários microrganismos são considerados probióticos; no entanto, as cepas de *Lactobacillus* e *Bifidobacterium* são as mais aplicadas e estudadas, sendo comumente encontradas no intestino humano (ALMADA *et al.*, 2021; TRAN *et al.*, 2020). O gênero *Bifidobacterium* reside majoritariamente no intestino grosso, enquanto o *Lactobacillus* habita o intestino delgado. Outros gêneros probióticos promissores incluem *Bacillus*, *Bacteroides*, *Enterococcus*, *Escherichia*, *Faecalibacterium*, *Propionibacterium* e *Saccharomyces*. Todavia, esses microrganismos são geralmente comercializados como suplementos, e não como ingredientes alimentícios integrados (MURALI; MANSELL, 2024).

O gênero *Lactobacillus* é composto por bactérias Gram-positivas e anaeróbias facultativas. Na natureza, existem pelo menos 60 espécies que constituem a maioria das bactérias ácido-láticas, definidas por sua capacidade de converter lactose e outros açúcares em ácido lático através da fermentação láctica. Esses microrganismos estão naturalmente presentes no trato gastrointestinal humano, representando uma parcela específica da microbiota intestinal residente (TUMBARSKI *et al.*, 2025).

Para que uma cepa bacteriana seja considerada probiótica, ela deve ser reconhecida como segura (*Generally Recognized As Safe* - GRAS), demonstrar efeitos comprovados à saúde, não apresentar resistência a antibióticos, possuir características sensoriais agradáveis aos consumidores, ser isenta de toxicidade, originar-se do trato gastrointestinal de indivíduos saudáveis e ser capaz de aderir eficientemente à mucosa intestinal, promovendo uma colonização eficaz (SZUTOWSKA, 2020). Os probióticos também precisam sobreviver de forma atenuada à passagem pelo trato digestivo, mantendo uma viabilidade mínima para beneficiar genuinamente a saúde do hospedeiro (SZUTOWSKA, 2020). Além disso, a capacidade de adesão à mucosa intestinal, a atividade antagonista, a produção de substâncias antimicrobianas e a resistência estável ao suco gástrico e aos sais biliares são algumas das características mandatórias avaliadas durante a seleção dos microrganismos (ROSELLI *et al.*, 2021).

Os produtos lácteos fermentados consistem nas principais matrizes alimentares para a entrega de probióticos. No entanto, o consumo desses produtos é limitado devido ao número crescente de indivíduos com intolerância à lactose, alergia às proteínas do leite de vaca, hipercolesterolemia ou que adotam dietas veganas e vegetarianas (LIU *et al.*, 2024). Portanto, veículos funcionais não lácteos, incluindo matrizes alimentares à base de frutas, têm sido amplamente investigados como alternativas viáveis.

As frutas são fundamentais para uma dieta equilibrada e amplamente reconhecidas por seus benefícios à saúde humana. Algumas espécies podem ser classificadas como alimentos funcionais devido ao seu alto teor de micronutrientes, tais como compostos fenólicos (notáveis, especialmente, por sua capacidade antioxidante), minerais e vitaminas (FERNANDES *et al.*, 2023; SAINI *et al.*, 2022). Entre as frutas tropicais, a acerola (*Malpighia emarginata*) e a laranja (*Citrus sinensis*) destacam-se não apenas pelo sabor agradável e refrescante, mas também pelo valor nutricional excepcional que oferecem (ALBUQUERQUE *et al.*, 2019). A acerola é rica em vitamina C, antioxidantes e minerais, enquanto a laranja fornece quantidades expressivas de vitamina C, fibras e

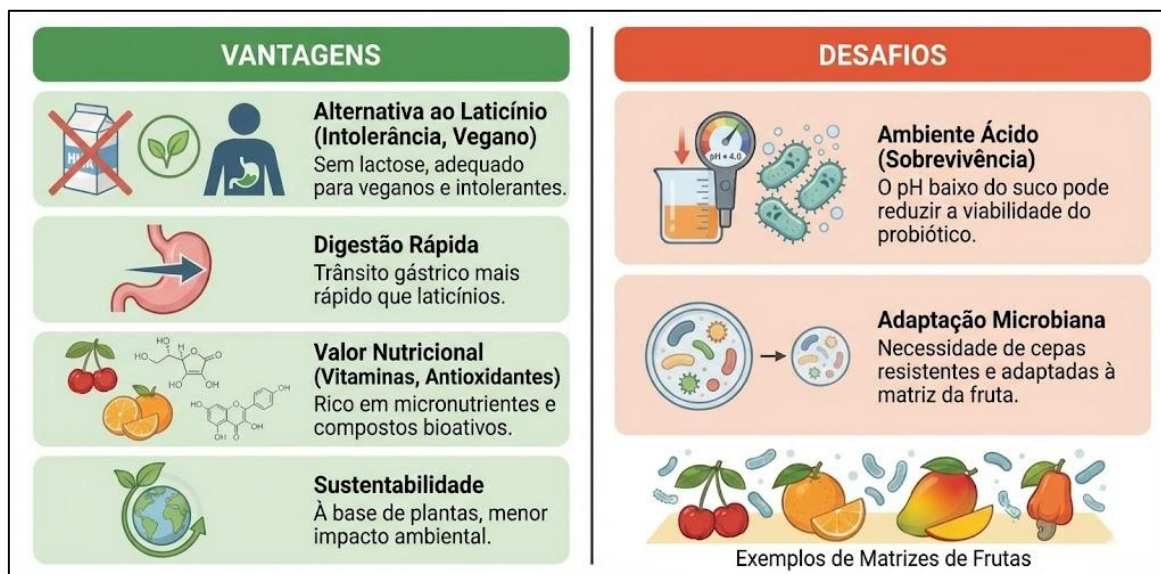
flavonoides antioxidantes. Esses sucos fortalecem o sistema imunológico e possuem propriedades antioxidantes e anti-inflamatórias reconhecidas. Comercialmente, são utilizados em sucos frescos, bebidas isotônicas e suplementos líquidos (LAURINDO *et al.*, 2024; TIENCHEU *et al.*, 2021).

Entretanto, o processamento industrial dessas matrizes apresenta desafios distintos. Seu alto teor de compostos termossensíveis, particularmente o ácido ascórbico, torna-os altamente suscetíveis à degradação nutricional durante a pasteurização térmica convencional. Ademais, a acidez naturalmente elevada dessas frutas — especialmente da acerola — impõe um ambiente desfavorável para a sobrevivência probiótica, limitando a vida útil (*shelf-life*) de produtos vivos e justificando a exploração de alternativas pós-bióticas obtidas por meio de tecnologias mais brandas (NASEEM *et al.*, 2023; VIGNALI *et al.*, 2022).

Uma vantagem adicional dos sucos de frutas é que sua digestão estomacal ocorre mais rapidamente do que a de produtos lácteos. Isso significa que os microrganismos passam menos tempo expostos ao ambiente severamente ácido do estômago (PIMENTEL *et al.*, 2019). Além de apresentarem um importante conteúdo nutricional, os sucos de frutas oferecem novas possibilidades de matrizes para a administração de probióticos. Diversos estudos recentes sobre o uso de sucos de frutas na produção de bebidas probióticas foram publicados, contemplando exemplos de matrizes eficientes para a entrega de bactérias probióticas, como manga (ADEBAYO-TAYO *et al.*, 2021), laranja (KARDOONI *et al.*, 2023), abóbora (DIMITROVSKI *et al.*, 2021), melão (FILHO *et al.*, 2017), caju (PEREIRA *et al.*, 2011; FILHO *et al.*, 2017) e cacau (FILHO *et al.*, 2019).

Embora as frutas ofereçam uma boa matriz para o crescimento probiótico, a sobrevivência desses microrganismos nesse ambiente é desafiadora, uma vez que as bactérias ácido-láticas precisam se proteger contra as condições ácidas severas das frutas tropicais (LILLO-PÉREZ *et al.*, 2021). Portanto, é fundamental aprofundar o conhecimento sobre as dinâmicas de produção de sucos de frutas fermentados para compreender como as etapas envolvidas impactam a estabilidade biológica global (Figura 2).

Figura 2 - Visão geral comparativa do uso de sucos de frutas como veículos não lácteos para probióticos.



Nota: O painel esquerdo destaca vantagens, como o status de isento de lactose, perfil nutricional rico em bioativos e sustentabilidade. O painel direito ilustra os principais desafios tecnológicos, especificamente a sobrevivência microbiana em pH ácido e a necessidade de adaptação da cepa à matriz vegetal.

Fonte: elaborada pelo autor com auxílio da ferramenta de inteligência artificial Gemini (2026).

Existem duas abordagens principais para transformar um suco de fruta em um alimento probiótico: a adição direta de microrganismos ao suco e a fermentação conduzida com microrganismos probióticos. A primeira consiste em uma técnica eficaz quando a cepa demonstra tolerância prévia ao ambiente ácido da fruta. No entanto, a fermentação oferece vantagens adicionais consolidadas, pois o crescimento da cepa microbiana na própria matriz resulta em um produto com menor teor de açúcares livres e em uma biomassa celular mais adaptada, o que culmina em maiores taxas de sobrevivência. Além disso, a fermentação promove a síntese de metabólitos secundários, como as bacteriocinas, que contribuem para a qualidade do produto ao prevenir contaminações microbianas ao longo do armazenamento (MANOJ *et al.*, 2023; NASEEM *et al.*, 2023).

A fermentação de sucos de frutas com cepas probióticas pode fornecer os mesmos benefícios à saúde digestiva e imunológica que os produtos lácteos fermentados convencionais, mas com o acréscimo de um perfil nutricional mais diversificado e de maior apelo a um público consumidor mais amplo (D'AMICO *et al.*, 2024). Ademais, sucos de frutas fermentados representam uma alternativa mais econômica e

ambientalmente sustentável, atendendo à crescente demanda por bebidas funcionais saudáveis no mercado global (SHORI; AL ZHRANI, 2022).

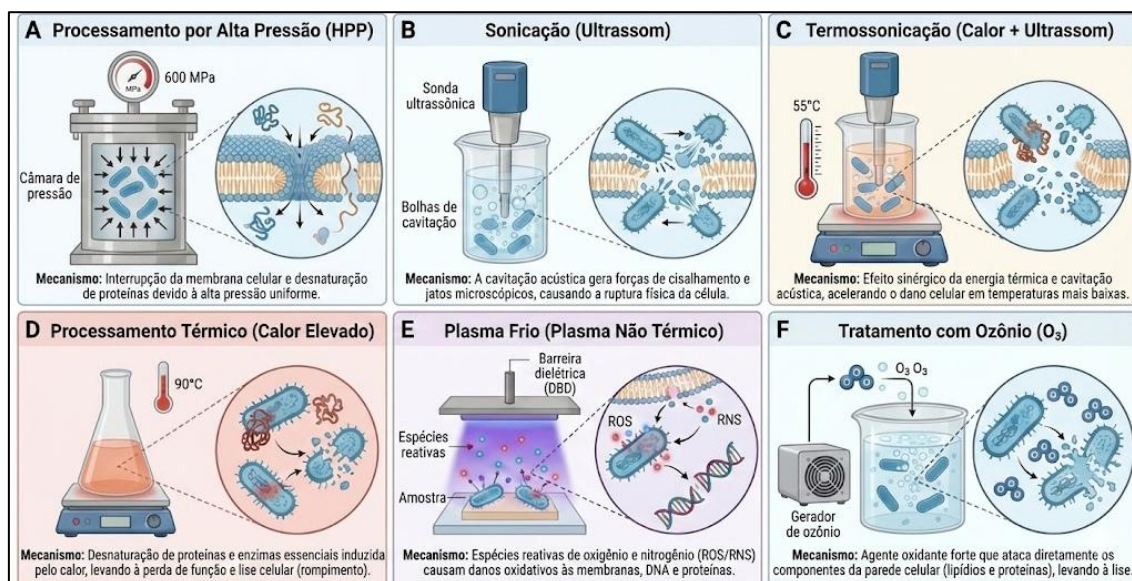
2.2 Probióticos a pós-bióticos: Obtenção via termossonicação e processamento térmico

Nos últimos anos, o interesse em probióticos e em seus efeitos benéficos à saúde cresceu exponencialmente. Contudo, um novo conceito está ganhando destaque no campo da ciência de alimentos e nutrição: os pós-bióticos. Ambos são componentes importantes para o bem-estar humano; no entanto, enquanto probióticos são microrganismos vivos, pós-bióticos são substâncias bioativas geradas pelos probióticos durante seu metabolismo ou derivadas de seus componentes celulares.

Diferentemente de seus equivalentes vivos, essas preparações microbianas inanimadas oferecem a vantagem de desvincular os benefícios à saúde da exigência de viabilidade celular. Essa mudança não apenas mitiga os desafios de sobrevivência em matrizes ácidas como sucos de frutas, mas também garante maior segurança e estabilidade durante o armazenamento, mantendo propriedades funcionais sem os riscos associados à administração de microrganismos vivos (VAMANU; DINU, 2025).

Conforme destacado por Aguilar-Toalá *et al.* (2018), uma variedade de técnicas de processamento é empregada para obter preparações pós-bióticas, particularmente aquelas que visam romper as células microbianas para liberar componentes intracelulares (Figura 3). Estas técnicas incluem alta pressão, ozônio, plasma frio, sonicação e termossonicação (NONGLAIT *et al.*, 2022). O método de inativação é fundamental, pois influencia diretamente a composição, integridade e funcionalidade dos compostos pós-bióticos resultantes, determinando, em última análise, seu potencial de promoção da saúde (BEEGUM; CHANDRAN, 2024; PIMENTEL *et al.*, 2023).

Figura 3 - Mecanismos celulares de inativação microbiana por tecnologias emergentes.



Nota: (A) Processamento de Alta Pressão (HPP): ruptura da membrana via pressão isostática. (B) Sonicação: lise física via cavitação e microjatos. (C) Termossonicação: efeito sinérgico de calor brando e cavitação acústica. (D) Processamento Térmico: desnaturação proteica induzida pelo calor. (E) Plasma Frio: dano oxidativo por espécies reativas (ROS/RNS). (F) Ozônio: oxidação direta dos componentes da parede celular.

Fonte: elaborada pelo autor com auxílio da ferramenta de inteligência artificial Gemini (2026).

Embora eficazes, as técnicas convencionais de inativação térmica enfrentam desafios, como a degradação de nutrientes termolábeis (incluindo vitaminas) e a alteração de características sensoriais, como sabor e textura. Além disso, o processamento térmico pode ser intensivo em energia, aumentando os custos de produção (CHACHA *et al.*, 2021).

Para superar esses desafios, tecnologias emergentes têm sido aplicadas na indústria de bebidas. As tecnologias emergentes são mais eficientes energeticamente, preservam melhor os nutrientes e compostos bioativos, mantêm as características sensoriais dos alimentos e permitem um controle de qualidade aprimorado e personalização do produto (GAZDA; GLIBOWSKI, 2024). Ademais, essas tecnologias reduzem o tempo de processamento, possuem menor impacto ambiental e oferecem maior flexibilidade para produtos não lácteos. Apesar de oferecerem benefícios significativos, essas tecnologias podem exigir investimentos iniciais mais altos e pesquisas adicionais para otimizar sua aplicação em larga escala (JADHAV; CHOUDHARY, 2024).

De uma perspectiva mecanística, a eficácia antimicrobiana dessas tecnologias emergentes não é governada unicamente pela energia térmica, distinguindo-as da pasteurização convencional. Em vez disso, elas dependem de estresses físicos e químicos

específicos para romper a integridade celular microbiana (GAZDA; GLIBOWSKI, 2024). Tecnologias como processamento de alta pressão e sonicação induzem danos mecânicos através de pressão isostática ou cavitação acústica (forças de cisalhamento e microjatos), levando à ruptura da parede celular e ao vazamento do conteúdo intracelular (FENG *et al.*, 2020). Por outro lado, métodos como plasma frio e aplicação de ozônio funcionam através de estresse oxidativo, gerando espécies reativas (ROS e RNS) que visam membranas celulares e material genético (FERNANDES; RODRIGUES, 2021; PANIGRAHI *et al.*, 2025). Mesmo em processos híbridos como a termossonicação, onde o calor é aplicado, a inativação é significativamente aprimorada pela ruptura física causada pela cavitação, permitindo uma redução microbiana eficaz em temperaturas mais baixas e, assim, preservando a matriz alimentar (NASCIMENTO *et al.*, 2025).

2.2.1. Termossonicação (TS)

A termossonicação (TS) é uma metodologia de processamento baseada na sinergia entre a aplicação de ultrassom (US) de alta intensidade, tipicamente na faixa de 20 kHz, e a manutenção concomitante de temperaturas moderadas (40-65 °C) (ALCÁNTARA-ZAVALA *et al.*, 2021). Esta técnica é classificada como uma tecnologia emergente, distinguindo-se fundamentalmente da pasteurização convencional por não depender primariamente de estresse térmico extremo para preservação, permitindo assim uma abordagem mais branda para a estabilização de matrizes alimentares (JAFARPOUR, 2022).

A pasteurização convencional utiliza calor elevado (ex.: 65-95 °C em sucos) para induzir a inativação de microrganismos patogênicos e enzimas (SILVA *et al.*, 2014). No entanto, este método está intrinsecamente associado à degradação térmica de biomoléculas termolábeis (ex.: vitaminas, compostos voláteis), resultando em perdas significativas de valor nutricional, alterações sensoriais (sabor e aroma) e modificações na cor do produto (ZIA *et al.*, 2024).

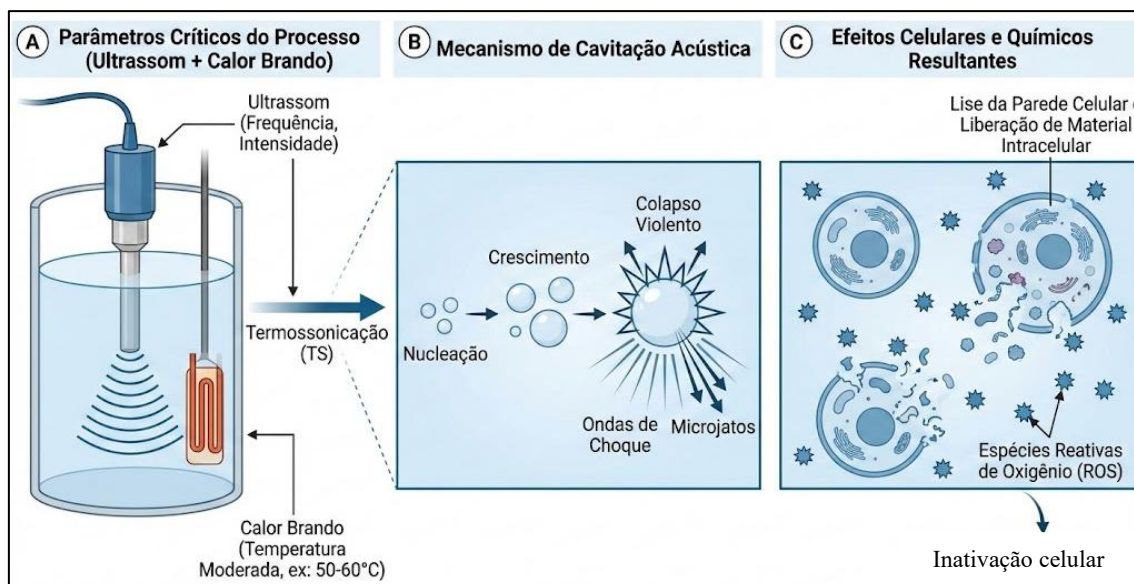
Em contrapartida, a termossonicação, devido à sua combinação otimizada de US e calor moderado, demonstrou eficiência superior na inativação microbiana e na preservação de compostos bioativos e características organolépticas em diversas matrizes (PANARO *et al.*, 2024). É crucial enfatizar que a termossonicação não é meramente a soma dos efeitos térmicos e acústicos; ao contrário, ela exibe um comportamento sinérgico (ABDULSTAR *et al.*, 2023).

A inativação microbiana induzida pela termossonicação é um fenômeno multifatorial mediado pela integração de estresses físicos, químicos e térmicos, sendo o principal mecanismo de ação a cavitação acústica transiente (SOTELO-LARA *et al.*, 2024). A cavitação transiente envolve a formação (nucleação), crescimento e colapso explosivo de microbolhas de gás e vapor no meio líquido, induzidos por ondas de ultrassom. O colapso dessas bolhas é um evento físico de extrema violência que gera (NUNES *et al.*, 2022):

- **Ondas de choque:** propagando-se em velocidades supersônicas, estas ondas incidem diretamente sobre as células.
- **Forças de cisalhamento:** forças hidrodinâmicas intensas atuam na interface líquido-célula.
- **Microjatos:** jatos líquidos de alta velocidade direcionados contra a superfície celular.

Essas forças mecânicas culminam na ruptura (lise) da parede celular e das membranas plasmáticas dos microrganismos, resultando no vazamento de material intracelular e no colapso de organelas e estruturas internas vitais (Figura 4) (ABDULSTAR *et al.*, 2023).

Figura 4 - Representação esquemática do processo de Termossonicação.



Nota: (A) Parâmetros críticos do processo (Ultrassom + Calor Brando). (B) Mecanismo de cavitação acústica, demonstrando a nucleação, crescimento e colapso violento de microbolhas, gerando ondas de choque e microjatos. (C) Efeitos celulares e químicos resultantes, incluindo a geração de espécies reativas de oxigênio (ROS), lise da parede celular e liberação de material intracelular.

Fonte: elaborada pelo autor com auxílio da ferramenta de inteligência artificial Gemini (2026)

Além do dano físico, o colapso das bolhas de cavitação provoca a pirólise (decomposição por calor intenso e pressão) e a sonólise (decomposição induzida por ultrassom) das moléculas de água (H_2O), levando à geração de espécies reativas de oxigênio (ROS), notadamente radicais livres altamente oxidativos como o radical hidroxila ($\bullet OH$). Estes radicais atacam o ácido desoxirribonucleico (DNA) e o ácido ribonucleico (RNA), induzindo mutações e inativando a capacidade de replicação, além de promover a inativação de enzimas essenciais para o metabolismo e sobrevivência celular. A formação de peróxido de hidrogênio (H_2O_2) secundária à sonicação também potencializa a ação bactericida (QIN *et al.*, 2024). A eficácia da termossonicação decorre da ação sinérgica desses estresses (físico, químico e térmico), tornando-a um método mais abrangente e eficaz contra uma ampla gama de microrganismos, incluindo aqueles com maior resistência a um único tipo de estresse.

Em contraste com a pasteurização convencional, a termossonicação também demonstrou consistentemente a capacidade de preservar ou, em alguns casos, aumentar o teor de compostos bioativos, alinhando as características nutricionais do produto processado intimamente com as do suco fresco (ANAYA-ESPARZA *et al.*, 2017; NASCIMENTO *et al.*, 2025; NASCIMENTO *et al.*, 2022). A melhoria no perfil bioativo pode ser atribuída à cavitação ultrassônica, que promove a ruptura das estruturas celulares e teciduais da fruta. Esse processo facilita a liberação e extração de compostos bioativos que, de outra forma, permaneceriam unidos a outras moléculas dentro da matriz celular (ABDULSTAR *et al.*, 2023).

Adicionalmente, enquanto a pasteurização térmica convencional (ex.: HTST) frequentemente induz a formação de *off-flavors* – muitas vezes descritos como notas de "cozido" – e a degradação de ésteres e aldeídos voláteis, a termossonicação oferece uma vantagem não térmica distinta. Ao operar em temperaturas mais brandas, a cavitação acústica facilita a retenção do perfil aromático original da matriz da fruta (JIA *et al.*, 2024; MAIA *et al.*, 2024). Essa preservação é particularmente crítica para sucos de acerola e laranja, pois evita a formação de notas oxidativas indesejáveis e garante um produto com aceitação organoléptica superior em comparação aos seus equivalentes tratados termicamente. Assim, a termossonicação pode ser vista não apenas como uma tecnologia de preservação, mas como uma ferramenta de otimização da matriz para enriquecimento nutricional, potencialmente resultando em um valor funcional superior ao do suco fresco

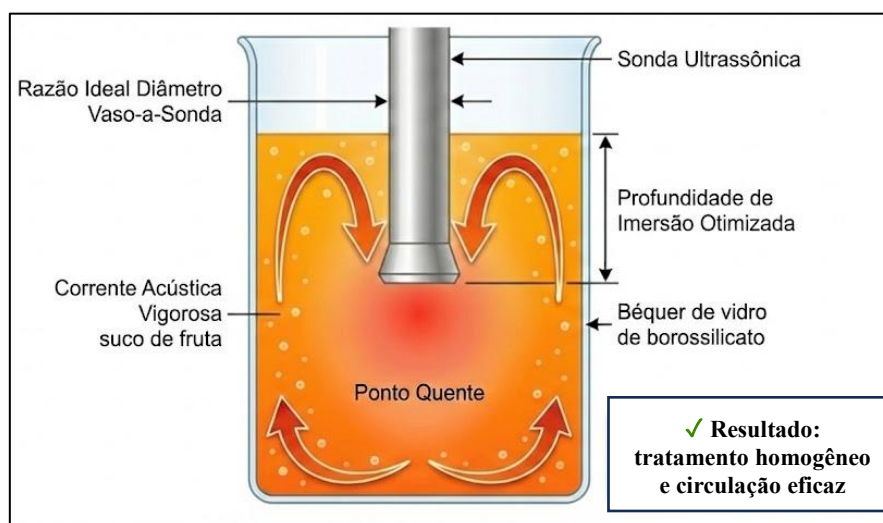
ou pasteurizado.

A termossonicação é considerada uma tecnologia "*eco-friendly*" devido ao seu perfil de sustentabilidade superior em comparação aos métodos térmicos convencionais, notadamente em relação ao menor consumo de energia e água (MGOMA *et al.*, 2025). A ausência da necessidade de calor intenso reduz significativamente o consumo de energia, e a falta de geração de resíduos tóxicos ou subprodutos nocivos alinha a tecnologia com as crescentes demandas por sustentabilidade na cadeia de valor alimentar (YIKMIŞ *et al.*, 2025). Economicamente, a termossonicação oferece o potencial para redução do tempo e custos de processamento, concomitante com o aumento do rendimento e qualidade (REŽEK JAMBRAK *et al.*, 2024).

Apesar de seu grande potencial, a escalabilidade industrial e a otimização de parâmetros permanecem desafios cruciais. A implementação generalizada da tecnologia depende do desenvolvimento de equipamentos de alto desempenho e da superação de barreiras de aceitação do consumidor em relação a produtos processados por novas tecnologias (MONTEIRO *et al.*, 2022; NASIR *et al.*, 2025). A transição desses benefícios econômicos e qualitativos para a escala industrial apresenta desafios de engenharia distintos, visto que a eficiência da termossonicação depende intimamente da uniformidade do campo acústico dentro da câmara de tratamento (KEWALRAMANI *et al.*, 2023). Em sistemas não otimizados, a atenuação das ondas sonoras pode levar a um processamento heterogêneo, resultando em "zonas mortas", onde a inativação é insuficiente, ou em "pontos quentes" (*hot spots*), que tendem a degradar a qualidade do produto (GOGATE *et al.*, 2001; GOGATE; PANDIT, 2004).

Para superar essas limitações e viabilizar aplicações industriais, a otimização do *design* do reator mostra-se indispensável para promover a dissipação uniforme de energia por todo o volume de fluido, independentemente do modo operacional (SINGLA; SIT, 2022). Em sistemas de batelada (Figura 5), essa homogeneidade pode ser alcançada principalmente pela definição de proporções geométricas adequadas entre o reator e a sonda – especificamente, a razão entre o diâmetro do recipiente e da sonda, bem como a profundidade de imersão. Essa configuração busca promover um escoamento acústico (*acoustic streaming*) vigoroso, impulsionando naturalmente a circulação do fluido através das zonas de cavitação ativa sem a necessidade de auxílios mecânicos externos (MERONI *et al.*, 2021).

Figura 5 - Otimização da geometria do reator em batelada para maximizar a eficiência da termossonicação.



Nota: O diagrama ilustra as proporções geométricas ideais entre a sonda ultrassônica e o recipiente (diâmetro e profundidade de imersão) necessárias para induzir um escoamento acústico vigoroso. Esta configuração previne zonas mortas e superaquecimento localizado (*hot spots*), garantindo tratamento homogêneo e circulação natural do fluido através da zona de cavitação ativa.

Fonte: elaborada pelo autor com auxílio da ferramenta de inteligência artificial Gemini (2026).

Como alternativa, a transição para reatores de fluxo contínuo – como câmaras com lacunas anulares estreitas ou *designs* tubulares – favorece que todo o volume de suco passe sequencialmente pela zona de máxima intensidade de cavitação (DONG *et al.*, 2020). Adicionalmente, o escalonamento (*scale-up*) da tecnologia de termossonicação requer uma abordagem de engenharia precisa para tentar manter a densidade de energia acústica (W/mL) e a intensidade (W/cm²) alcançadas em escala de bancada. O projeto deve também incorporar uma transferência de calor eficiente para controlar o aumento de temperatura induzido pelo efeito sinérgico da cavitação, auxiliando na preservação da qualidade sensorial e nutricional da matriz alimentar enquanto a segurança microbiológica é estabelecida (FAN *et al.*, 2021; MERONI *et al.*, 2021).

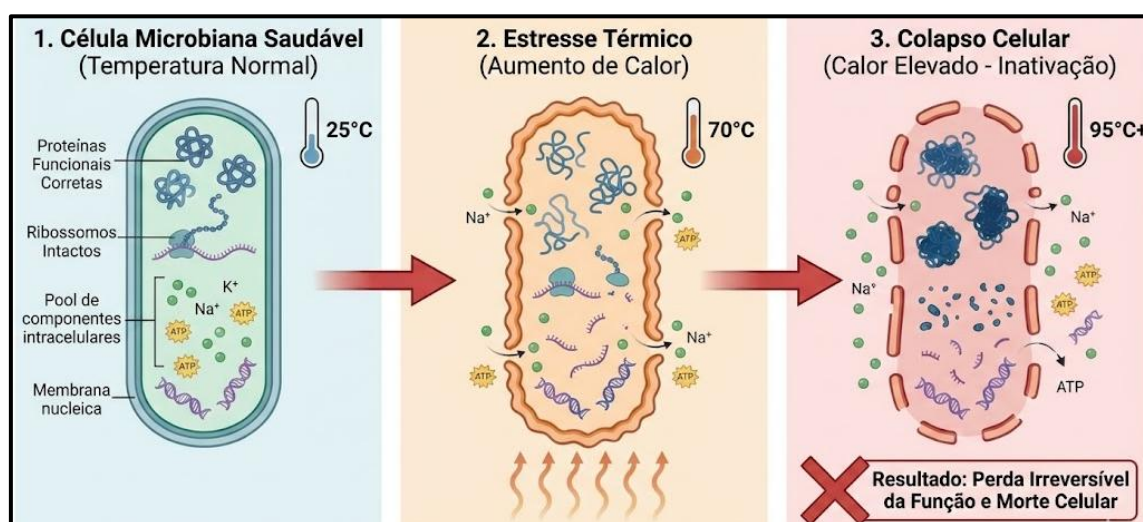
2.2.2. Processamento térmico (TH)

A inativação térmica permanece um processo fundamental na indústria de bebidas, essencial para garantir a segurança microbiológica e estender a vida útil do produto (AGHAJANZADEH *et al.*, 2023). Este processo envolve a aplicação de calor para

eliminar microrganismos patogênicos e deteriorantes (bactérias, vírus, leveduras e bolores), visando minimizar efeitos prejudiciais ao perfil sensorial e nutricional (KERNOU *et al.*, 2023). As estratégias mais comuns incluem a pasteurização – variando de Baixa Temperatura Longo Tempo (LTLT), que favorece a retenção de nutrientes, a Alta Temperatura Curto Tempo (HTST), amplamente utilizada em sucos (PETRUZZI *et al.*, 2017; SILVA *et al.*, 2014) – e o tratamento Ultra Alta Temperatura (UHT) ($>135^{\circ}\text{C}$), que garante esterilidade comercial e estabilidade à temperatura ambiente, embora com potenciais modificações sensoriais (POLAK *et al.*, 2024).

De uma perspectiva mecanística, a inativação térmica não é um evento único, mas uma ruptura cumulativa de estruturas celulares vitais (Figura 6). O mecanismo fundamental envolve a desnaturação irreversível de proteínas e enzimas intracelulares críticas, levando à coagulação e perda de função biológica (CEBRIÁN *et al.*, 2017). Concomitantemente, o calor altera a fluidez e integridade da membrana celular, causando o vazamento de componentes intracelulares vitais – como íons, ATP e ácidos nucleicos – levando eventualmente ao colapso celular (DEAK; MOHÁCSI-FARKAS, 2023). Além disso, estudos recentes indicam que o estresse térmico visa especificamente os ribossomos, causando degradação do rRNA e interrompendo a síntese proteica, marcando frequentemente o "ponto de não retorno" para o microrganismo (CEBRIÁN *et al.*, 2017).

Figura 6 - Mecanismo sequencial de inativação térmica microbiana.



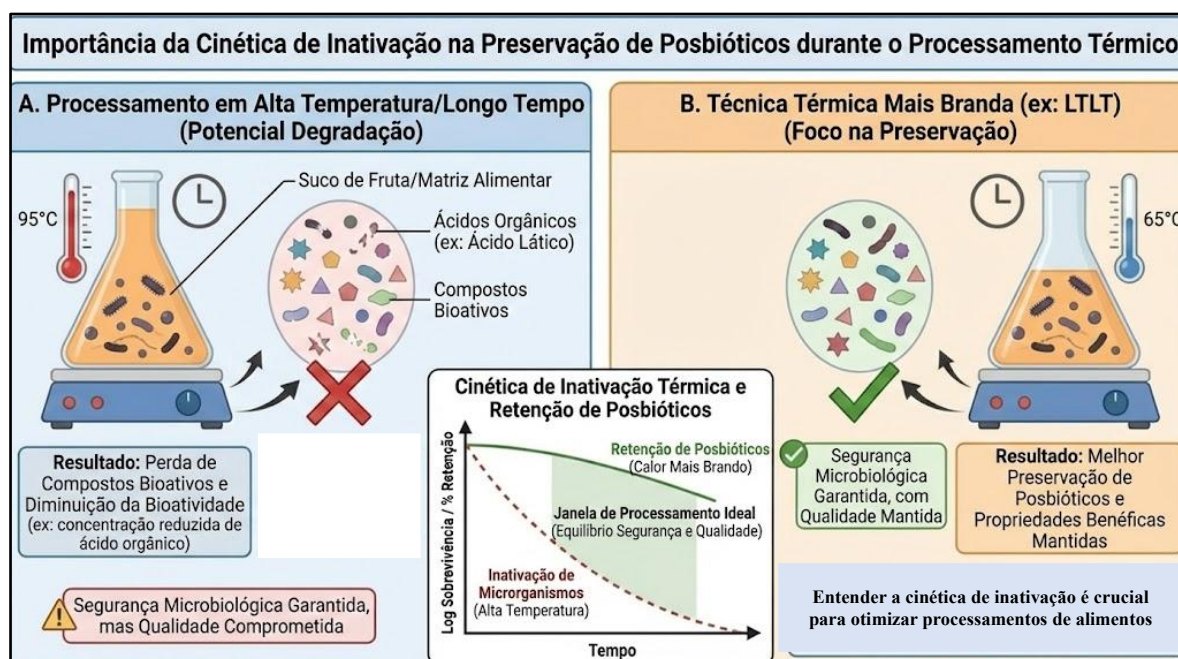
Nota: O processo é ilustrado como uma ruptura cumulativa: (1) Célula saudável em homeostase. (2) Início do estresse térmico, causando desnaturação proteica, dano à membrana e vazamento de eletrólitos. (3) Colapso celular irreversível sob alta temperatura, caracterizado por perda total de função, lise e morte celular.

Fonte: elaborada pelo autor com auxílio da ferramenta de inteligência artificial Gemini (2026).

No contexto de bebidas funcionais contendo pós-bióticos, o processamento térmico desempenha um papel duplo e crítico (JANSSEUNE *et al.*, 2025). Por um lado, a aplicação controlada de calor facilita a liberação de compostos bioativos intracelulares (como bacteriocinas, ácidos orgânicos e ácidos graxos de cadeia curta como o butirato) ao induzir a lise celular e liberar metabólitos ligados à célula (BARROS *et al.*, 2020). Além de simplesmente liberar metabólitos existentes, o processamento térmico também pode influenciar a geração de novas frações pós-bióticas. Sob estresse térmico, o próprio processo de inativação pode liberar proteínas e peptídeos bioativos específicos que exibem efeitos anti-inflamatórios e antioxidantes, transformando efetivamente a bebida em uma fonte de compostos terapêuticos naturais (SUN *et al.*, 2023).

Por outro lado, a estabilidade térmica desses compostos liberados é dependente do binômio tempo-temperatura (Figura 7). A exposição excessiva ao calor pode degradar moléculas sensíveis, reduzindo sua atividade antimicrobiana e benefícios à saúde, como aqueles fornecidos pelo butirato para a saúde intestinal (SHARAFI *et al.*, 2024; ZÓLKIEWICZ *et al.*, 2020). Portanto, otimizar o perfil térmico – frequentemente favorecendo técnicas mais brandas como LTLT – é crucial para equilibrar a máxima recuperação de pós-bióticos via ruptura celular enquanto previne sua subsequente degradação química (THORAKKATTU *et al.*, 2022; VIGNALI *et al.*, 2022).

Figura 7 - Impacto da cinética de inativação térmica na retenção de pós-bióticos.



Nota: (A) Processamento de alta temperatura/longo tempo garante segurança, mas degrada compostos sensíveis (ex.: ácidos orgânicos). (B) Técnicas térmicas brandas (ex.: LTLT) ou otimizadas visam equilibrar

a curva de inativação microbiana (segurança) com a curva de retenção de pós-bióticos (qualidade), resultando em um produto funcionalmente superior.

Fonte: elaborada pelo autor com auxílio da ferramenta de inteligência artificial Gemini (2026).

Em resumo, embora a otimização de parâmetros térmicos (ex.: LTLT) possa mitigar alguns efeitos negativos, a dependência exclusiva da energia térmica frequentemente força um *trade-off* entre eficiência do processo (tempo) e qualidade do produto. Essa limitação ressalta a necessidade de estratégias de preservação híbridas. Ao combinar tratamentos térmicos brandos com estressores físicos – como a cavitação acústica na termossonicação – torna-se possível alcançar a liberação benéfica de pós-bióticos e a inativação microbiana em temperaturas significativamente mais baixas e tempos de processamento mais curtos, superando assim as desvantagens intrínsecas do aquecimento convencional.

2.2.3. Modelagem cinética da inativação microbiana

Prever a sobrevivência microbiana sob estresse é fundamental para projetar protocolos seguros de processamento de alimentos. No processamento térmico convencional, a inativação microbiana tipicamente segue uma cinética de primeira ordem, descrita pelo modelo de Bigelow (BIGELOW, 1921). Esse comportamento linear implica que os microrganismos morrem a uma taxa constante, permitindo que a eficiência do processo seja quantificada pelo valor D (tempo de redução decimal) e a sensibilidade à temperatura pelo valor Z .

No entanto, a aplicação de tecnologias emergentes, como a termossonicação, frequentemente resulta em curvas de sobrevivência complexas que se desviam da linearidade. Esses desvios são frequentemente caracterizados por "ombros" (indicando uma resistência inicial ou necessidade de acúmulo de danos) ou "caudas" (sugerindo uma subpopulação remanescente de sobreviventes resistentes). Nestes casos, modelos lineares falham em prever com precisão os tempos de esterilização, necessitando o uso de modelos probabilísticos não lineares (EVELYN; SILVA, 2015).

O modelo de distribuição de Weibull é amplamente reconhecido como uma alternativa robusta para descrever esses comportamentos não lineares (WEIBULL, 1951). Definido por dois parâmetros – o fator de escala (b), relacionado à taxa de reação, e o fator de forma (n) – ele fornece uma interpretação física da curva de inativação. Um fator

de forma $n < 1$ descreve uma curva com concavidade voltada para cima ("cauda"), frequentemente atribuída à heterogeneidade biológica ou fenômenos físicos como agrupamento celular e distribuição desigual de energia dentro da câmara de tratamento. Por outro lado, $n > 1$ descreve uma curva com concavidade voltada para baixo ("ombro"). Compreender esses perfis cinéticos é essencial para a engenharia de reatores ultrassônicos, pois a presença de "caudas" pode indicar ineficiências do processo, como a formação de ondas estacionárias ou zonas mortas, que comprometem a uniformidade do tratamento (GOGATE *et al.*, 2001; GOGATE; PANDIT, 2004).

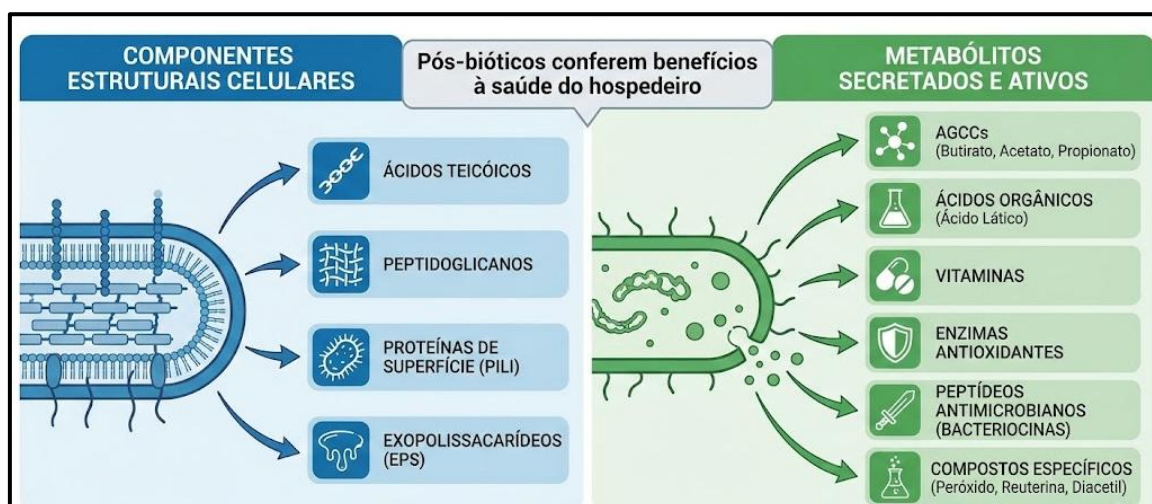
2.3 Pós-bióticos: definição, composição bioativa e mecanismos funcionais

Enquanto os benefícios dos probióticos são bem estabelecidos, sua aplicação é frequentemente restringida pela estrita exigência de viabilidade celular, que é desafiada pelas condições de processamento e trânsito gástrico (D'AMICO *et al.*, 2024). Consequentemente, o foco científico deslocou-se para os pós-bióticos, um conceito que desvincula os benefícios à saúde da viabilidade microbiana (XIA *et al.*, 2024; XIAO *et al.*, 2024).

De acordo com a definição de consenso da *International Scientific Association for Probiotics and Prebiotics* (ISAPP), pós-bióticos são uma "preparação de microrganismos inanimados e/ou seus componentes que confere um benefício à saúde do hospedeiro". Esta categoria abrange uma matriz heterogênea de componentes bioativos, que podem ser amplamente classificados em elementos celulares estruturais e metabólitos secretados (SALMINEN *et al.*, 2021).

Componentes estruturais incluem ácidos teicoicos, peptidoglicanos, proteínas de superfície celular (*pili*) e exopolissacarídeos (EPS) (AGGARWAL *et al.*, 2022). Metabólitos secretados compreendem uma rica "caixa de ferramentas enzimática e química" gerada durante a fermentação ou liberada após a lise, incluindo ácidos graxos de cadeia curta (AGCCs, como butirato, acetato e propionato), ácidos orgânicos (ácido láctico), vitaminas, enzimas antioxidantes e peptídeos antimicrobianos (bacteriocinas), bem como compostos específicos como peróxido de hidrogênio, reuterina e diacetil (BEEGUM; CHANDRAN, 2024). A Figura 8 mostra a classificação e composição dos pós-bióticos.

Figura 8 - Classificação e composição dos pós-bióticos.



Nota: O diagrama ilustra a natureza heterogênea dos pós-bióticos, dividindo-os em duas categorias principais que conferem benefícios à saúde: os componentes estruturais inanimados da célula bacteriana (à esquerda, em azul) e os metabólitos bioativos secretados ou liberados pelo microrganismo (à direita, em verde).

Fonte: elaborada pelo autor com auxílio da ferramenta de inteligência artificial Gemini (2026).

Os pós-bióticos podem ser encontrados em vários alimentos fermentados ou extraídos de cepas produtoras, com ênfase particular nos gêneros *Lactobacillus* e *Bifidobacterium* (BUENO *et al.*, 2025). No contexto específico de matrizes à base de plantas, como sucos de frutas, o perfil pós-biótico é ainda mais enriquecido pela biotransformação de compostos fenólicos (BELWAL *et al.*, 2018; OLIVEIRA *et al.*, 2022). Diferentemente das matrizes lácteas, substratos de frutas como a acerola são ricos em polifenóis complexos. O metabolismo probiótico e as tecnologias de processamento podem converter essas moléculas complexas em metabólitos fenólicos menores e mais biodisponíveis, com atividades antioxidantes e anti-inflamatórias aprimoradas, adicionando uma dimensão funcional distinta e superior aos pós-bióticos derivados de frutas em comparação aos de base láctea (NASCIMENTO *et al.*, 2025; NASCIMENTO *et al.*, 2022).

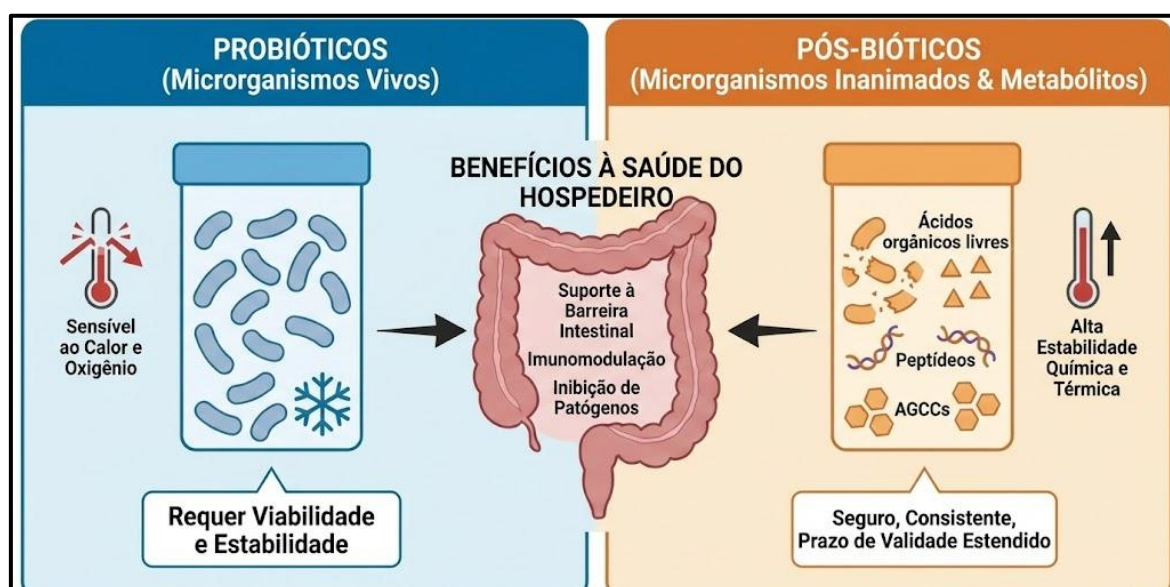
Pós-bióticos apresentam diversas vantagens sobre probióticos (Figura 9), principalmente porque a inativação microbiana confere propriedades altamente desejáveis para a indústria (YEŞİLYURT *et al.*, 2021; ZHU *et al.*, 2025):

- **Estabilidade química:** exibem uma estrutura química estável, facilitando a formulação.
- **Segurança e consistência:** possuem parâmetros de dosagem seguros e

consistentes, evitando os desafios logísticos e de segurança inerentes à administração de microrganismos vivos. Isso os torna uma alternativa mais segura para populações vulneráveis.

- **Vida útil estendida:** sua natureza inanimada resolve o desafio tecnológico de manter a viabilidade, permitindo a produção de produtos com vida útil prolongada quando usados em alimentos, bebidas ou suplementos nutricionais.

Figura 9 - Comparação conceitual e funcional entre Probióticos e Pós-bióticos.



Nota: O painel esquerdo destaca a dependência da viabilidade e a sensibilidade térmica dos probióticos. O painel direito enfatiza as vantagens dos pós-bióticos: estabilidade química e térmica, segurança na dosagem e vida útil estendida, mantendo benefícios à saúde comparáveis via metabólitos e componentes celulares.

Fonte: elaborada pelo autor com auxílio da ferramenta de inteligência artificial Gemini (2026).

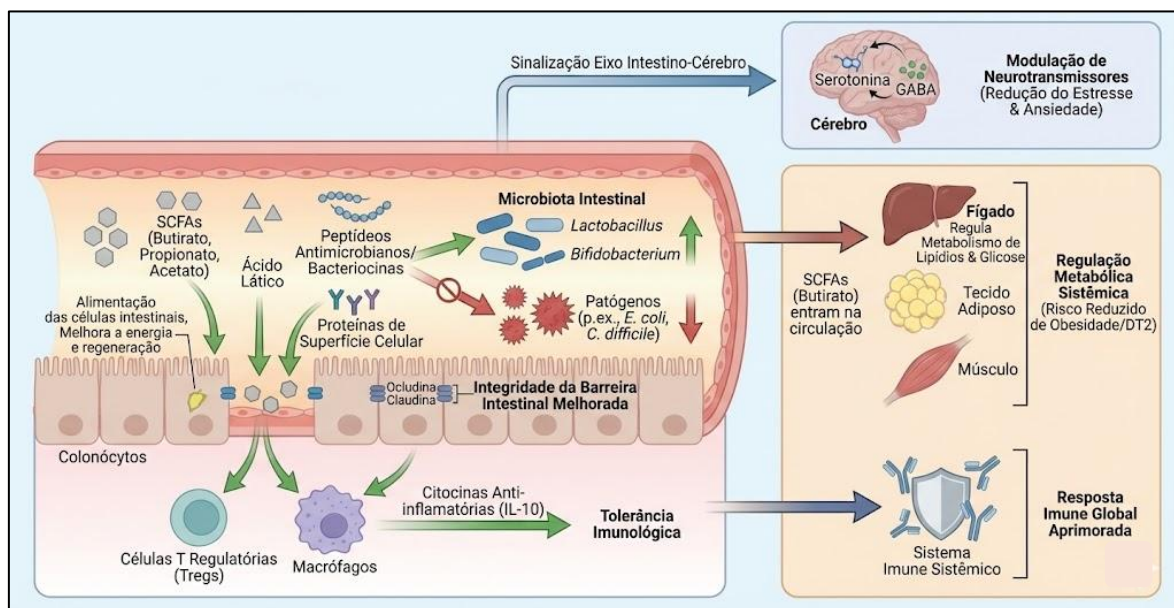
Em um contexto mais amplo, estudos demonstraram que pós-bióticos são capazes de mimetizar os efeitos terapêuticos dos probióticos, induzindo respostas fisiológicas como modulação do sistema imunológico e promoção de um ambiente intestinal saudável, sem a necessidade de microrganismos vivos (PELUZIO *et al.*, 2021; VAMANU; DINU, 2025). Portanto, o uso de pós-bióticos como alternativa aos probióticos pode representar uma solução mais segura e eficaz, especialmente para populações vulneráveis, como idosos ou indivíduos imunocomprometidos.

A microbiota intestinal desempenha um papel central na manutenção da homeostase do hospedeiro, e os pós-bióticos emergem como um arsenal terapêutico

promissor para modular este ecossistema através de quatro mecanismos primários (Figura 10):

- I. **Modulação da microbiota intestinal e atividade antimicrobiana:** compostos como AGCCs, ácido láctico e bacteriocinas exercem influência direta na comunidade microbiana (PELUZIO *et al.*, 2021). Essa modulação manifesta-se estimulando o crescimento de bactérias comensais benéficas via alimentação cruzada (*cross-feeding*), enquanto inibe patógenos como *Clostridium difficile* e *Escherichia coli* através de acidificação e ação antimicrobiana direta (ex.: formação de poros em membranas) (LIU *et al.*, 2022; XUE *et al.*, 2024).
- II. **Reforço da barreira intestinal:** pós-bióticos contribuem diretamente para a integridade da mucosa. A administração de pós-bióticos, particularmente butirato, regula positivamente a expressão de proteínas de junção oclusiva (*tight junctions*, como ocludina e claudina), que são fundamentais para a coesão epitelial (GUO *et al.*, 2025). Além disso, o butirato serve como a principal fonte de energia para os colonócitos, promovendo a regeneração celular e prevenindo o *leaky gut* (intestino permeável), uma condição associada à inflamação sistêmica (KALKAN *et al.*, 2025).
- III. **Imunomodulação:** a interação entre pós-bióticos e o sistema imunológico intestinal (GALT) constitui um mecanismo-chave de seus efeitos terapêuticos. Pós-bióticos modulam a atividade de células T reguladoras (Tregs) e macrófagos, induzindo a produção de citocinas anti-inflamatórias como IL-10 (PARK *et al.*, 2024). Essa regulação é crítica para o manejo de Doenças Inflamatórias Intestinais (DII) e prevenção de respostas inflamatórias excessivas (VENTURA *et al.*, 2024).
- IV. **O eixo intestino-cérebro:** evidências emergentes destacam o papel dos pós-bióticos na comunicação bidirecional entre o intestino e o cérebro (JIANG *et al.*, 2024). Metabólitos microbianos, incluindo neurotransmissores e AGCCs, podem cruzar a barreira intestinal e sinalizar o sistema nervoso central. Especificamente, o butirato influencia a produção de serotonina e GABA, potencialmente reduzindo respostas fisiológicas ao estresse e ansiedade. O GABA funciona como o principal neurotransmissor inibitório no sistema nervoso central, contribuindo para a redução da hiperexcitabilidade neuronal, enquanto a serotonina derivada do intestino regula a motilidade gastrointestinal e a sinalização vagal (XU; LU, 2025).

Figura 10 - Mecanismos de ação dos pós-bióticos na modulação da saúde intestinal e sistêmica.



Nota: A figura detalha as interações moleculares dos componentes pós-bióticos (AGCCs, peptídeos, ácidos orgânicos) com o hospedeiro, resultando em: (1) Reforço da barreira intestinal (junções oclusivas); (2) Modulação do sistema imunológico (tolerância e resposta anti-inflamatória); (3) Inibição de patógenos; (4) Regulação metabólica sistêmica e sinalização neuroprotetora via eixo intestino-cérebro.

Fonte: elaborada pelo autor com auxílio da ferramenta de inteligência artificial Gemini (2026).

Em última análise, a eficácia desses pós-bióticos tratados térmica ou sonicamente deve ser validada não apenas pela sua estabilidade química, mas pela sua capacidade biológica de modular a microbiota intestinal do hospedeiro (uma interação crítica que determina seu verdadeiro potencial funcional).

2.4 Hipótese científica e estrutura da tese

Com base na revisão abrangente da literatura, hipotetiza-se que, embora a energia térmica seja o principal fator da inativação microbiana, a aplicação sinérgica de energia acústica (termossonicação, TS) — quando otimizada através de um *design* geométrico preciso do reator — aprimora significativamente a cinética de inativação e a bioatividade pós-biótica em comparação ao processamento térmico convencional isolado (TH). Postula-se que os efeitos mecânicos específicos da cavitação, combinados com o calor, criam um ambiente de estresse único que não apenas garante a estabilidade microbiológica, mas também facilita uma liberação mais eficiente de metabólitos

funcionais.

Para validar esta hipótese e abordar as lacunas científicas identificadas, esta tese está estruturada em três estudos experimentais complementares, nos quais o processamento térmico e a termossonicação foram sistematicamente comparados:

- O **Capítulo 3** aborda o desenvolvimento do suco de acerola pós-biótico, avaliando a estabilidade, a preservação de compostos bioativos e a atividade antibacteriana *in vitro* ao longo do armazenamento refrigerado.
- O **Capítulo 4** aprofunda-se na engenharia do processo, modelando a cinética de inativação celular e elucidando o impacto crítico da geometria do reator e das propriedades acústicas na previsibilidade e eficiência da termossonicação.
- O **Capítulo 5** transpõe a validação para o modelo biológico *in vitro*, avaliando as assinaturas ecológicas e o perfil metabólico impulsionados por matrizes processadas por TS e TH na microbiota intestinal humana, utilizando um modelo estático de digestão *in vitro* e fermentação colônica.

3 OBTENÇÃO DE SUCOS DE ACEROLA POTENCIALMENTE PÓS-BIÓTICOS POR TERMOSSONICAÇÃO E PROCESSAMENTO TÉRMICO

RESUMO

Os pós-bióticos, definidos como células microbianas não viáveis ou seus componentes que conferem benefícios à saúde do hospedeiro, emergiram como ingredientes funcionais promissores para produtos seguros e estáveis em prateleira. Este estudo teve como objetivo desenvolver suco de acerola pós-biótico por meio da fermentação com *Lactocaseibacillus casei* NRRL B-442, seguida de termossonicação (TS; 3300 W·L⁻¹, 60–65 °C, 10 min) ou tratamento térmico (TH; 80 °C, 10 min). Tanto a TS quanto o TH inativaram efetivamente a cepa probiótica, preservando os principais compostos bioativos. O conteúdo fenólico total variou de 1,22 a 1,46 g/L, e os níveis de ácido ascórbico foram mantidos entre 2,36 ± 0,1 e 2,78 ± 0,1 g/L. A atividade antioxidante permaneceu estável, com valores de ABTS entre 16.516 ± 246 e 16.689 ± 249 µmol Trolox/L, e valores de FRAP variando de 2860 ± 130 a 2910 ± 160 µg Fe²⁺/mL. Esses parâmetros não apresentaram degradação significativa ($p > 0,05$) ao longo de 35 dias de armazenamento refrigerado (4 °C). A TS a 60 °C aumentou a atividade antibacteriana em amostras dialisadas, atingindo 65% de inibição contra *Escherichia coli* e 56% contra *Salmonella Typhimurium* (em 7 log UFC/mL), superando o TH a 80 °C (51% e 57%, respectivamente). O efeito antibacteriano permaneceu estável durante o armazenamento refrigerado, confirmando a termossonicação como uma estratégia viável para a produção de bebidas pós-bióticas funcionais e microbiologicamente seguras.

Palavras-chave: Ultrassom; Processamento térmico; Alimento funcional; Fermentação probiótica; *Malpighia emarginata*.

3.1 Introdução

A eficácia dos produtos alimentícios probióticos depende do número de células viáveis e ativas por grama ou mililitro no momento do consumo (TERPOU *et al.*, 2019). Por outro lado, produtos contendo microrganismos inanimados não estão sujeitos a essa limitação (AGUILAR-TOALÁ *et al.*, 2018; NATARAJ *et al.*, 2020). Nesse contexto, emergiu o termo "pós-biótico", referindo-se a uma preparação de microrganismos inanimados e/ou seus componentes que conferem benefícios à saúde do hospedeiro (SALMINEN *et al.*, 2021). Além das células inativadas, o termo pós-bióticos também engloba componentes solúveis, como vitaminas, ácidos orgânicos, enzimas, ácidos graxos de cadeia curta (AGCCs), peptídeos e proteínas de superfície celular, entre outros (BARROS *et al.*, 2020; CUEVAS-GONZÁLEZ; LICEAGA; AGUILAR-TOALÁ, 2020).

O interesse nos pós-bióticos tem crescido devido à sua ampla gama de propriedades funcionais, incluindo atividades antimicrobiana, antioxidante e imunomoduladora (NATARAJ *et al.*, 2020). Embora os probióticos possam ser consumidos pela maior parte da população, os pós-bióticos são particularmente promissores para indivíduos imunocomprometidos, pois atenuam o risco de infecção associado ao consumo de microrganismos vivos (BARROS *et al.*, 2020; YEŞİLYURT *et al.*, 2021). Estudos demonstram que pós-bióticos derivados de bactérias lácticas possuem propriedades inibitórias contra diversos microrganismos, incluindo *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Salmonella* spp., *Yersinia* spp., *Aeromonas* spp. e *Bacillus* spp., bem como contra vírus, leveduras e fungos filamentosos (ALGBOORY; MUHIALDIN, 2021; İNCILI *et al.*, 2022; MUHIALDIN; KADUM; MEOR HUSSIN, 2021; SHIRKHAN *et al.*, 2023).

Os pós-bióticos podem se originar de estruturas celulares microbianas ou metabólitos produzidos durante a fermentação microbiana em ambientes ricos em nutrientes. Conforme destacado por Aguilar-Toalá *et al.* (2018), uma variedade de técnicas de processamento é utilizada para obter preparações pós-bióticas, especialmente aquelas destinadas ao rompimento de células microbianas para liberar componentes intracelulares. Essas técnicas incluem tratamentos térmicos e de alta pressão, hidrólise enzimática, cocultivo, extração por solvente, inativação química e sonicação. O método de inativação é decisivo, pois influencia diretamente a composição, a integridade e a funcionalidade dos compostos pós-bióticos resultantes, determinando, em última análise, o seu potencial de promoção da saúde.

Tecnologias emergentes estão sendo exploradas para otimizar a segurança e a funcionalidade em alimentos pós-bióticos. O ultrassom surge como um método de processamento rápido e ecologicamente correto que ajuda a preservar nutrientes e compostos bioativos, ao mesmo tempo em que prolonga a vida de prateleira (NUNES *et al.*, 2022; OLIVEIRA *et al.*, 2022). No entanto, o ultrassom isoladamente é insuficiente para uma inativação microbiana eficaz. Portanto, a combinação do ultrassom com um tratamento térmico, processo conhecido como termossonicação, tem se provado uma abordagem eficaz para aumentar a eficiência dessa tecnologia na inativação microbiana, com impacto reduzido na qualidade geral do alimento (FAN *et al.*, 2022; JAFARPOUR, 2022). Essa técnica tem se mostrado promissora para a produção de formulações pós-bióticas com maior potencial antioxidante e antibacteriano.

A atividade metabólica das cepas de bactérias lácticas e a sua capacidade de produzir metabólitos benéficos dependem significativamente da matriz alimentar, das condições de fermentação e dos parâmetros de armazenamento, resultando em perfis pós-bióticos distintos (RODRIGUES *et al.*, 2019). A fermentação láctica de sucos de frutas tem sido explorada como uma estratégia sustentável para a produção de bioconservantes naturais (FILHO *et al.*, 2017; FILHO *et al.*, 2019; FONTELES *et al.*, 2013; PEREIRA *et al.*, 2017; PEREIRA; MACIEL; RODRIGUES, 2011). Durante a fermentação de sucos, as bactérias lácticas podem produzir compostos antimicrobianos e antioxidantes, como peróxido de hidrogênio, diacetil, bacteriocinas, peptídeos e compostos fenólicos (MUHIALDIN; KADUM; MEOR HUSSIN, 2021).

Entre os sucos de frutas, a acerola (*Malpighia emarginata*) se destaca devido ao seu conteúdo excepcionalmente alto de vitamina C e compostos fenólicos, tornando-se uma candidata atraente para o desenvolvimento de bebidas funcionais. Apesar desses benefícios, o seu baixo pH e o teor limitado de açúcares representam desafios para a fermentação probiótica.

Diante desse contexto, o presente estudo teve como objetivos: (1) desenvolver e caracterizar um suco de acerola fermentado contendo potenciais pós-bióticos de *Lactocaseibacillus casei* NRRL B-442 inativados por termossonicação ou processamento térmico; (2) avaliar as mudanças nos compostos bioativos e na atividade antibacteriana; e (3) avaliar a estabilidade e a funcionalidade dos sucos durante o armazenamento refrigerado (4 °C) por 35 dias.

3.2 Materiais e métodos

3.2.1 Preparo do suco

A polpa de acerola congelada e pasteurizada foi diluída em água potável (100 g de polpa de acerola para 200 mL de água). A polpa de acerola foi adquirida no comércio local sem conservantes (Nossa Fruta Brasil®, Fortaleza, Brasil).

2.2 Preparo e enumeração do *Lacticaseibacillus casei*

O *Lacticaseibacillus casei* (anteriormente *Lactobacillus casei*) NRRL B-442 foi obtido da Coleção de Culturas NRRL (Departamento de Agricultura dos Estados Unidos, Peoria, Illinois, EUA). A cultura de estoque de *L. casei* NRRL B-442 foi ativada em caldo MRS (30 °C, 16 h) para obter uma concentração celular inicial de aproximadamente 9,0 log UFC/mL.

Para a quantificação da enumeração celular, duas técnicas de plaqueamento foram empregadas de forma complementar. Na técnica de microgotas (HERIGSTAD; HAMILTON; HEERSINK, 2001), um total de 10 µL de cada diluição seriada foi inoculado em placas de ágar MRS (divididas em quatro quadrantes), estabelecendo-se um limite de detecção teórico de 2,0 log UFC/mL (100 UFC/mL). Adicionalmente, empregou-se a técnica de espalhamento em superfície (*spread plate*) (TAYLOR *et al.*, 1983), na qual um volume de 100 µL da amostra foi espalhado uniformemente sobre o ágar MRS, propiciando um limite de detecção mais sensível, correspondente a 1,0 log UFC/mL (10 UFC/mL). Todas as placas foram preparadas em triplicata, enumerando-se apenas as diluições que apresentaram contagens dentro das faixas estatisticamente recomendadas para cada técnica, de modo a garantir a confiabilidade dos resultados.

3.2.3 Fermentação do suco de acerola

Devido ao baixo pH e teor de açúcar do suco de acerola, 25 g/L de glicose foram suplementados ao suco, e o pH foi ajustado para 5,5. A fermentação foi realizada em frascos Schott estéreis (500 mL) contendo 400 mL de suco com 1% (v/v) da cultura ativada de *L. casei* (descrita na Seção 3.2) a 30 °C por 8 h, sem agitação. Após a fermentação, ácido cítrico foi adicionado para restaurar o pH ao seu valor inicial de 3,5.

3.2.4 Termossonicação (TS)

Os sucos de acerola fermentados foram submetidos a processamento por ultrassom utilizando um dispositivo de ultrassom tipo sonda (Unique modelo USD500, 18 kHz, Ultronique, São Paulo, Brasil) equipado com uma macrossonda de titânio de 13 mm imersa 1,5 cm abaixo da superfície do líquido. Os sucos (150 mL) foram processados em um reator de vidro encamisado de 250 mL (89 mm × 69,5 mm). A termossonicação (TS) foi aplicada a uma intensidade de potência de $3300 \text{ W} \cdot \text{L}^{-1}$ por 10 min a temperaturas de $50 \pm 2 \text{ }^{\circ}\text{C}$, $60 \pm 2 \text{ }^{\circ}\text{C}$ e $65 \pm 2 \text{ }^{\circ}\text{C}$ (Tabela 1). Um banho-maria de circulação externo foi utilizado para o controle da temperatura. O processamento por TS foi iniciado após o suco atingir a temperatura desejada. Após o tratamento, o suco foi imediatamente arrefecido em banho de gelo, conforme descrito por Nascimento; Santos; Rodrigues (2022).

3.2.5 Processamento térmico (TH)

O tratamento térmico foi realizado em banho-maria (SOLAB, São Paulo, Brasil) a uma temperatura controlada de $80 \pm 2 \text{ }^{\circ}\text{C}$ por 10 min. O tempo foi cronometrado após o suco atingir a temperatura desejada. Em seguida, o suco foi arrefecido em banho de gelo. O volume de trabalho foi de 100 mL de suco de acerola fermentado. A Tabela 1 apresenta os seis produtos avaliados no presente estudo.

Tabela 1 – Sucos de acerola potencialmente pós-bióticos processados por termossônica e calor.

Codificação de amostra	Descrição
NF	Suco natural de acerola (suco não fermentado)
PRO	Suco de acerola probiótico (fermentado e não processado)
TS50	Suco de acerola pós-biótico (fermentado e submetido a processamento ultrassônico a 50 °C)
TS60	Suco de acerola pós-biótico (fermentado e submetido a processamento ultrassônico a 60 °C)
TS65	Suco de acerola pós-biótico (fermentado e submetido a processamento ultrassônico a 65 °C)
TH80	Suco de acerola pós-biótico (fermentado e submetido a processamento térmico a 80 °C)

Fonte: elaborada pelo autor (2026).

3.2.6 Estabilidade durante o armazenamento frio

Após a fermentação e o subsequente processamento por TS e TH, os parâmetros foram avaliados durante o armazenamento a 4 °C por 35 dias. Ao longo do período de armazenamento, amostras de cada suco foram coletadas periodicamente para monitorar as alterações na viabilidade de *L. casei*, contagens microbianas, produção de ácido lático, teor de ácido ascórbico, consumo de glicose, atividade antioxidante e compostos fenólicos totais.

3.2.7 Determinação de açúcares e ácidos orgânicos

Um sistema HPLC Agilent equipado com um detetor UV-DAD a 210 nm e um detetor de índice de refração (IR) foi utilizado para avaliar os açúcares e os ácidos orgânicos. Os ácidos orgânicos (lático e ascórbico) foram separados usando uma coluna Aminex BIORAD HPX-87H (300 × 7,8 mm, Bio-Rad Laboratories, Califórnia, EUA) a 50 °C. Ácido sulfúrico (5 mM) a uma taxa de fluxo de 0,4 mL/min foi utilizado como fase móvel. O tempo total de corrida foi de 40 min. A glicose foi separada utilizando uma coluna Supelcogel™ Ca (300 × 7,8 mm, Merck Supelco, Darmstadt, Alemanha) a 80 °C. Água ultrapura foi utilizada como fase móvel a 0,5 mL/min. Os açúcares foram detectados por um detetor de índice de refração (IR) a 35 °C. Cada corrida durou 30 min. As

metodologias de HPLC foram empregadas de acordo com Nascimento; Santos; Rodrigues (2022).

3.2.8 Compostos fenólicos totais

O teor de fenólicos totais foi determinado pelo método de Folin-Ciocalteu, conforme descrito por OLIVEIRA *et al.* (2018). Uma alíquota de 10 µL de cada amostra foi misturada com 200 µL de reagente de Folin-Ciocalteu (diluído 1:10 em água destilada). Após 3 min de incubação no escuro a 25 °C, adicionaram-se 100 µL de uma solução de Na₂CO₃ a 4%. A mistura foi incubada e a absorbância foi lida a 765 nm. A quantificação foi realizada utilizando uma curva-padrão de ácido gálico (AG), e os resultados foram expressos em gramas de equivalentes de ácido gálico (EAG) por litro (g EAG/L).

3.2.9 Atividade antioxidante

A atividade antioxidante *in vitro* foi avaliada de acordo com Fonteles *et al.* (2024), utilizando os ensaios do sal diamônio do ácido 2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolina-6-sulfônico) (ABTS) e do poder antioxidante redutor do ferro (FRAP), que representam ações de diferentes compostos antioxidantes. Para o ensaio ABTS⁺, as soluções de estoque foram as seguintes: ABTS⁺ 7 mM (solução A); e solução de persulfato de potássio 140 mM (solução B). A solução de trabalho foi preparada misturando 5000 µL da solução A e 88 µL da solução B, permitindo que reagissem por 16 h à temperatura ambiente (28 °C) no escuro. A solução foi diluída misturando a solução de ABTS⁺ com etanol absoluto para obter uma absorbância de $0,700 \pm 0,02$ a 734 nm. Os sucos diluídos (30 µL) reagiram com 3000 µL de solução ABTS⁺ por 6 min no escuro. Etanol foi utilizado como branco. As absorbâncias foram lidas a 734 nm. Trolox 2 mM foi utilizado como padrão antioxidante; os resultados foram expressos em µmol de Trolox/L.

Para o ensaio FRAP, as soluções de estoque incluíram tampão acetato 300 mM (3,1 g de C₂H₃NaO₂·3H₂O e 16 mL de C₂H₄O₂), pH 3,6, solução de TPTZ (2,4,6-tripiridil-s-triazina) 10 mM em HCl 40 mM, e solução de FeCl₃·6H₂O 20 mM. A solução de trabalho foi preparada na hora, misturando tampão acetato, 250 µL de TPTZ e 250 µL de FeCl₃·6H₂O; a solução foi então aquecida a 37 °C antes da análise. A amostra (15 µL) reagiu com 285 µL da solução FRAP por 30 min no escuro. As medições do produto colorido (complexo ferroso-tripiridil-triazina) foram realizadas a 593 nm. Uma curva-

padrão de vitamina C 1 M foi preparada, e os resultados foram expressos em $\mu\text{g Fe}^{2+}/\text{mL}$.

3.2.10 Qualidade microbiológica

A enumeração total de leveduras e bolores foi realizada pelo plaqueamento em superfície de 100 μL da diluição da amostra em meio ágar-batata. Todas as placas foram preparadas em triplicata, e apenas as placas contendo de 30 a 300 colônias foram enumeradas para garantir a confiabilidade estatística. As contagens médias de colônias ($\pm$ desvio-padrão) foram calculadas, e os resultados foram expressos em log de unidades formadoras de colônias por mililitro de suco (log UFC/mL). Leveduras e bolores foram monitorizados especificamente neste estudo porque representam os principais microrganismos deteriorantes em sucos de frutas ácidas, como a acerola, em que o ambiente de baixo pH favorece o seu crescimento (TOURNAS; HEERES; BURGESS, 2006).

3.2.11 Ensaio de atividade antibacteriana

As amostras de suco de acerola fermentado e processado foram centrifugadas a $10.000 \times g$ por 20 min a 4 °C. Os sobrenadantes foram recolhidos e dialisados por 24 h utilizando membranas com limite de exclusão molecular de 12 kDa em água destilada para remover o ácido lático. Após a diálise, as amostras foram ajustadas para 25 g/L de glicose e pH 6,0.

Escherichia coli ATCC 25922 e a *Salmonella Typhimurium* ATCC 14028 foram cultivadas em caldo nutriente (Merck Millipore, Darmstadt, Alemanha) a 30 °C e 125 rpm por 16 h (*overnight*). As suspensões bacterianas foram diluídas em série e ajustadas para concentrações de 4, 5 e 7 log UFC/mL de acordo com a sua densidade ótica (DO) a 600 nm. As contagens em placas de ágar nutriente (método de inoculação em microgotas) confirmaram as contagens.

Um ensaio em microplaca foi utilizado para avaliar a atividade antibacteriana (% de inibição de crescimento). Em placas de 96 poços, 100 μL de cada amostra de suco (centrifugada e/ou dialisada) foram misturados com 100 μL de suspensão bacteriana (4, 5 e 7 log UFC/mL) e incubados a 30 °C por 24 h. A absorbância a 600 nm foi medida às 0 e 24 h utilizando um leitor de microplacas (Bio-Tek Instruments, EUA). A atividade antibacteriana foi calculada utilizando a Equação 1:

$$\text{Atividade antibacteriana (\%)} = 100 - \left(\frac{\Delta ABS_{amostra}}{\Delta ABS_{controle\ negativo}} * 100 \right) \quad (1)$$

Onde:

- **Amostra de 24 h:** 100 µL de suco probiótico ou pós-biótico + 100 µL de suspensão bacteriana (*E. coli* ou *S. typhimurium*), incubados por 24 h a 30 °C;
- **Amostra de 0 h:** 100 µL de suco probiótico ou pós-biótico + 100 µL de suspensão bacteriana (*E. coli* ou *S. typhimurium*), medidos imediatamente (0 h) a 30 °C;
- **Controle negativo de 24 h:** 100 µL de caldo nutriente + 100 µL de suspensão bacteriana (*E. coli* ou *S. typhimurium*), incubados por 24 h a 30 °C;
- **Controle negativo de 0 h:** 100 µL de caldo nutriente + 100 µL de suspensão bacteriana (*E. coli* ou *S. typhimurium*), medidos imediatamente (0 h) a 30 °C.

Um controle positivo composto por 100 µL de solução de ácido láctico (3 g/L) + 100 µL de suspensão bacteriana (*E. coli* ou *S. typhimurium*) também foi avaliado.

3.2.12 Análise estatística

Os ensaios foram realizados em réplicas, e a análise em triplicata (n = 6). Análise de Variância (ANOVA) seguida do teste *post-hoc* de Tukey (p < 0,05), a um nível de confiança de 95%, foi aplicada aos dados pertinentes. Os dados foram tratados utilizando o software Statistica (TIBCO, StatSoft 14.0.0.15).

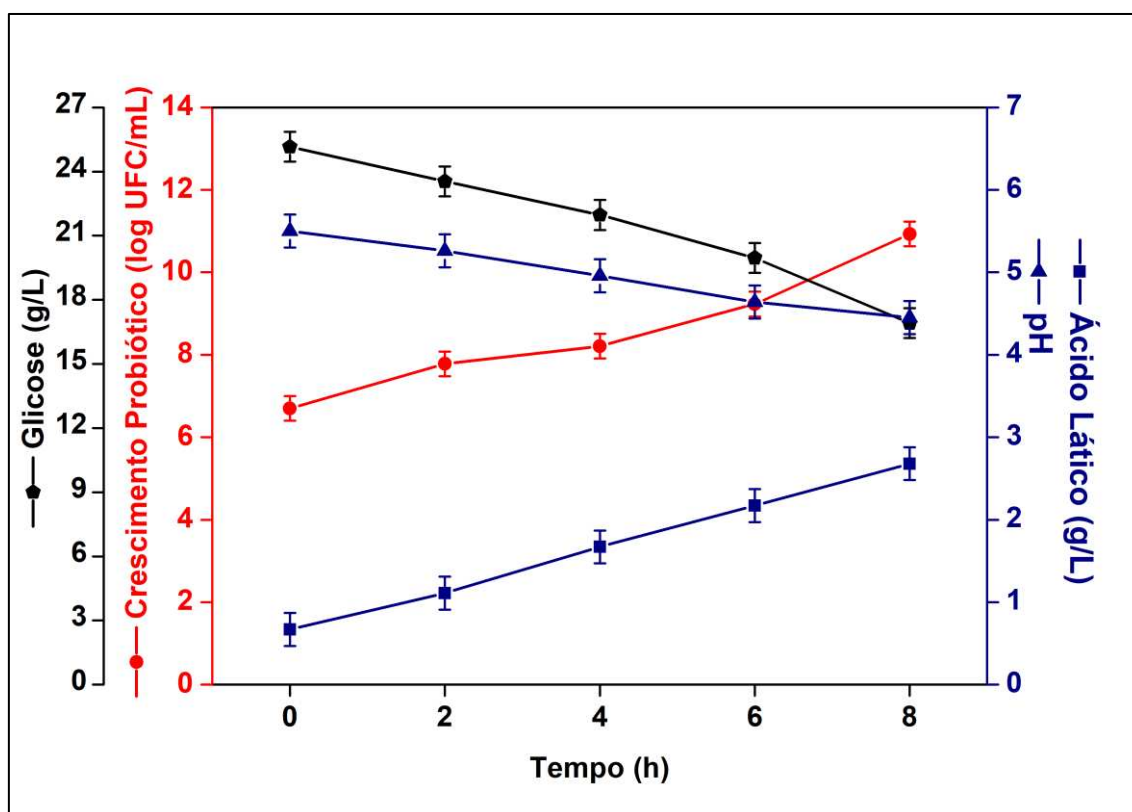
3.3 Resultados e discussão

3.3.1 Fermentação do suco de acerola por *L. casei*

O *L. casei* NRRL B-442 fermentou efetivamente o suco de acerola, exibindo uma alta taxa de crescimento ao utilizar a glicose adicionada como fonte de carbono. As contagens de células viáveis de *L. casei* nos sucos de acerola fermentados são apresentadas na Figura 1. Após 8 h de fermentação, a viabilidade celular foi de 10,9 log UFC/mL, partindo de uma contagem inicial de 6,70 log UFC/mL, e consumindo aproximadamente 32,4% da glicose inicial. Esses valores estão acima do limite mínimo de 6–7 log UFC/mL tipicamente exigido para a funcionalidade probiótica e alegações de

saúde (PEREIRA; RODRIGUES, 2018; RASIKA *et al.*, 2021). Após 8 h de fermentação, o *L. casei* produziu $2,7 \pm 0,1$ g/L de ácido láctico, resultando numa queda de pH de 5,5 para 4,5.

Figura 1 - Crescimento de *L. casei* NRRL B-442 (log UFC/mL) (●) consumo de glicose (g/L) (◆), pH (▲) e formação de ácido láctico (g/L) (■) durante a fermentação.



Fonte: elaborada pelo autor (2026).

Em um estudo anterior conduzido pelo nosso grupo de pesquisa, o suco de acerola foi efetivamente fermentado por *L. casei* NRRL B-442, tanto com quanto sem a adição de prebióticos, resultando em crescimento microbiano e produção de metabólitos (NASCIMENTO; SANTOS; RODRIGUES, 2022). No entanto, a adição de uma fonte de carbono externa favoreceu o crescimento microbiano. No presente estudo, a glicose foi adicionada ao suco de acerola para aumentar as contagens microbianas.

Os presentes resultados concordam com aqueles relatados em estudos semelhantes. Filho *et al.* (2019) avaliaram a fermentação do suco de cacau por *L. casei* NRRL B-442 (pH 6,2, 33 °C e 12 h) e relataram uma contagem probiótica máxima de aproximadamente 9 log UFC/mL e produção de ácido láctico de 4,3 g/L após 24 h. O suco probiótico de caju (pH 6,4, 30 °C e 16 h) apresentou contagem probiótica de 8,43 log UFC/mL e produção

de ácido láctico de $2,9 \pm 0,01$ g/L (PEREIRA; MACIEL; RODRIGUES, 2011); o suco probiótico de melão (pH 6,1, 31 °C e 12 h) apresentou contagens de 8,85 log UFC/mL e produção de ácido láctico de $3,9 \pm 0,01$ g/L (FONTELES *et al.*, 2013).

A Tabela 2 apresenta as alterações nas concentrações de ácido ascórbico, atividade antioxidante (ABTS e FRAP) e compostos fenólicos no suco de acerola probiótico após 8 h de fermentação. O processo de fermentação melhorou significativamente o perfil bioativo do suco de acerola ($p < 0,05$), levando a aumentos nos compostos fenólicos totais ($1,44 \pm 0,05$ g/L), ácido ascórbico ($2,40 \pm 0,10$ g/L) e atividade antioxidante medida pelos ensaios ABTS (19.196 ± 272 µmol Trolox/L) e FRAP (3170 ± 150 µg Fe²⁺/mL) (Tabela 2).

Tabela 2 – Concentrações de atividade antioxidante (ABTS e FRAP), ácido ascórbico e compostos fenólicos após 8 h de fermentação no suco de acerola fermentado.

Parâmetro	Suco Fermentado de Acerola	
	0 h	8 horas
Compostos fenólicos (g/L)	$1,35 \pm 0,1^a$	$1,44 \pm 0,1^a$
Ácido Ascórbico (g/L)	$1,88 \pm 0,1^b$	$2,40 \pm 0,1^a$
ABTS (µmol trolox/L)	17.316 ± 261^b	19.196 ± 272^a
FRAP (µg Fe ²⁺ /mL)	3.090 ± 150^a	3.170 ± 150^a

Nota: letras diferentes na mesma linha indicam diferenças estatisticamente significativas ($p < 0,05$) pelo teste de Tukey.

Fonte: elaborada pelo autor (2026).

Metabólitos microbianos gerados na fermentação podem facilitar a liberação de compostos bioativos ligados à parede celular, como taninos, flavonoides e ácidos fenólicos, aumentando assim a sua biodisponibilidade. Além disso, a hidrólise de estruturas fenólicas complexas em formas livres também contribui para as concentrações elevadas de compostos fenólicos (LEONARD *et al.*, 2021). Esses achados destacam o potencial da fermentação para melhorar as propriedades funcionais de matrizes de sucos de frutas, alinhando-se com o trabalho de XU *et al.* (2023), que relataram melhorias semelhantes na vitamina C, fenólicos totais e atividade antioxidante em suco de cítricos fermentado com cepas de *Lactobacillus*.

Tran *et al.* (2020) não encontraram alterações estatisticamente significativas ($p \leq 0,05$) na atividade antioxidante ou no conteúdo fenólico total após 24 h de fermentação de suco de toranja com *L. plantarum* 01, *L. fermentum* D13, *L. rhamnosus* B01725 e *B.*

bifidum B7.5. De forma semelhante, Dzandu *et al.* (2022) não observaram melhoria notável ($p \leq 0,05$) na capacidade antioxidante em sucos de tomate fermentados por 72 h com *L. rhamnosus* ATCC 53103 e *L. casei* ATCC 393. Esses achados demonstram que o suco de acerola suplementado com glicose é uma matriz de fermentação adequada para o *L. casei* NRRL B-442.

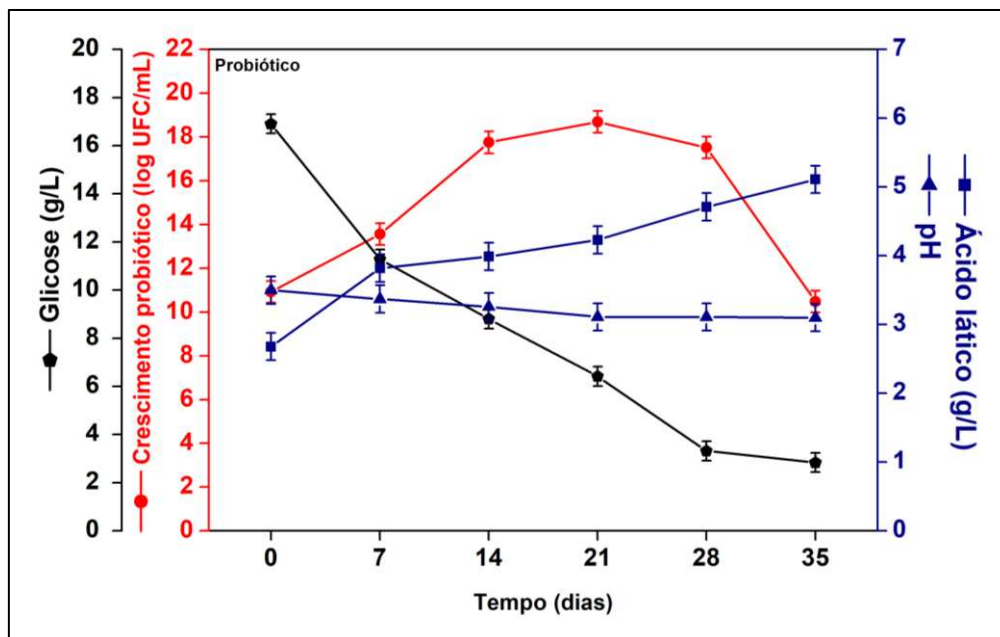
3.3.2 Estabilidade do probiótico durante o armazenamento refrigerado

Garantir a viabilidade dos probióticos ao longo da produção e do armazenamento é essencial para manter as alegações de saúde decorrentes do consumo de probióticos (FILHO *et al.*, 2019). No entanto, preservar a estabilidade de microrganismos vivos apresenta um desafio tecnológico significativo, uma vez que muitas cepas probióticas são sensíveis a estressores ambientais, como a exposição ao oxigênio e temperaturas extremas.

Após a fermentação, o suco de acerola probiótico foi armazenado a 4 °C por 35 dias. A Figura 2 mostra as contagens de células viáveis de *L. casei* B-442, as concentrações de ácido láctico, o pH e a glicose no suco de acerola probiótico ao longo do armazenamento a 4 °C. No suco probiótico, foram observadas alterações significativas na viabilidade celular durante o período de armazenamento ($p < 0.05$). Um aumento na contagem probiótica de aproximadamente 7 ciclos logarítmicos foi observado após 21 dias de armazenamento. No entanto, a contagem celular diminuiu em 8 ciclos logarítmicos entre os dias 21 e 35 de armazenamento.

Concomitantemente, uma diminuição na concentração de glicose de aproximadamente 83% foi observada ao longo do período de armazenamento, confirmando a atividade microbiana. Apesar dessa redução, que foi causada pela depleção de glicose, a contagem de células viáveis permaneceu consistentemente acima de $10,00 \pm 0,5 \log \text{ UFC/mL}$ (Figura 2), o que excede o limite mínimo tipicamente exigido para a funcionalidade probiótica em alimentos fermentados (TERPOU *et al.*, 2019; NASCIMENTO; SANTOS; RODRIGUES, 2022; RASIKA *et al.*, 2021).

Figure 2 - Crescimento de *L. casei* NRRL B-442 (log UFC/mL) (●) consumo de glicose (g/L) (◆), pH (▲) e formação de ácido lático (g/L) (■) ao longo do armazenamento a 4 °C.



Fonte: elaborada pelo autor (2026).

Os presentes achados concordam com Filho *et al.* (2019), que relataram que a viabilidade do *L. casei* em suco de cacau probiótico suplementado com sacarose aumentou até o 21º dia de armazenamento a 4 °C. No entanto, um declínio na viabilidade foi observado após o dia 28, passando de $8,99 \pm 0,02$ para $7,52 \pm 0,01$ log UFC/mL no dia 42. Esses resultados destacam o comportamento dinâmico da viabilidade das bactérias lácticas em matrizes de frutas ácidas e ricas em açúcares durante o armazenamento refrigerado.

A viabilidade de microrganismos probióticos em produtos alimentícios é influenciada por vários fatores ao longo da produção, processamento e armazenamento, sendo o ácido lático um determinante-chave. Ao longo do período de armazenamento de 35 dias, observamos um aumento de 91% na concentração de ácido lático (de $2,68 \pm 0,15$ g/L para $5,11 \pm 0,25$ g/L; $p < 0,05$) no suco de acerola probiótico, enquanto os valores de pH caíram de 3,5 para 3,1 (Figura 2). O aumento do ácido lático era esperado, dado que o *L. casei* mantém a sua atividade metabólica mesmo sob condições refrigeradas. Esses achados são consistentes com Maciel, Campelo e Rodrigues (2022), que relataram um aumento no teor de ácido lático no suco funcional de sapota-do-solimões, de $6,00 \pm 0,01$ g/L para $8,00 \pm 0,01$ g/L em 15 dias de armazenamento.

A Tabela 3 apresenta as alterações nas concentrações de ácido ascórbico, atividade antioxidante (ABTS e FRAP) e compostos fenólicos no suco de acerola probiótico durante o armazenamento a 4 °C. A concentração de ácido ascórbico permaneceu estável durante o período de armazenamento de 35 dias, com valores variando de $2,45 \pm 0,15$ g/L a $2,55 \pm 0,15$ g/L (Tabela 3). A atividade antioxidante (FRAP) seguiu uma tendência semelhante, mantendo valores entre 3150 ± 150 e 3250 ± 150 $\mu\text{g Fe}^{2+}/\text{mL}$ (Tabela 3). O método FRAP avalia o potencial antioxidante com base na capacidade de doação de elétrons em vez de átomos de hidrogênio (ADEBO; MEDINA-MEZA, 2020).

Tabela 3 – Concentrações de atividade antioxidante (ABTS e FRAP), ácido ascórbico e compostos fenólicos no início e no final do armazenamento refrigerado no suco de acerola fermentado.

Parâmetro	Armazenamento refrigerado	
	Dia 0	Dia 35
Compostos fenólicos (g/L)	1.40 ± 0.1^a	1.17 ± 0.1^b
Ácido Ascórbico (g/L)	2.45 ± 0.1^a	2.55 ± 0.1^a
ABTS ($\mu\text{mol trolox/L}$)	$19,290 \pm 272^a$	$16,289 \pm 261^b$
FRAP ($\mu\text{g Fe}^{2+}/\text{mL}$)	3150 ± 150^a	3250 ± 150^a

Nota: letras diferentes na mesma linha indicam diferenças estatisticamente significativas ($p < 0,05$) pelo teste de Tukey.

Fonte: elaborada pelo autor (2026).

Esses achados sugerem uma relação entre o ácido ascórbico e a atividade FRAP no suco de acerola fermentado. Corroborando essa observação, ADEBAYO-TAYO *et al.* (2021) relataram estabilidade no teor de vitamina C no suco de manga probiótico armazenado a 4 °C, variando de 41,35 a 48,77 mg/100 mL, após 4 semanas.

Em contraste, observou-se uma redução significativa ($p < 0,05$) nos compostos fenólicos (Tabela 3), diminuindo de $1,40 \pm 0,10$ para $1,17 \pm 0,10$, e na atividade antioxidante (ABTS), que variou de 19.290 ± 272 para 16.289 ± 261 $\mu\text{mol Trolox/L}$. O método ABTS mede a capacidade de antioxidantes lipofílicos e hidrofílicos de neutralizar o cátion radical 2,2'-azinobis-(3-etilbenzotiazolina-6-sulfônico), refletindo o potencial antioxidante geral do suco (WU *et al.*, 2021). As tendências observadas sugerem uma relação entre o teor de fenólicos totais e a capacidade antioxidante ABTS no suco de acerola fermentado.

3.3.3 Produção de pós-bióticos por termossonicação (TS) e processamento térmico (TH)

A inativação do microrganismo probiótico após a fermentação é necessária para conferir o status de pós-biótico ao suco fermentado. Embora o processamento ultrassônico seja geralmente considerado menos prejudicial aos compostos bioativos do que os tratamentos térmicos convencionais, a sua eficácia e impacto podem variar significativamente dependendo das características da matriz alimentar e dos parâmetros operacionais específicos aplicados (HASHEMI *et al.*, 2023). O processamento preliminar por ultrassom a 25 °C resultou em apenas 10% de inativação de *L. casei*. Como este estudo teve como objetivo obter preparações pós-bióticas que requerem inativação microbiana completa, essa condição foi considerada insuficiente e excluída do delineamento experimental final.

A inativação completa (redução $\geq 10,9$ ciclos logarítmicos) do *L. casei* NRRL B-442 foi alcançada no suco de acerola fermentado utilizando termossonicação (TS: 3300 W·L⁻¹, 10 min a 60–65 °C) e tratamento térmico (TH: 80 °C, 10 min). Em contraste, a TS a 50 °C resultou em uma redução máxima de 63% (redução ≤ 8 ciclos logarítmicos), destacando o efeito sinérgico dependente da temperatura entre o ultrassom e o calor para uma inativação probiótica eficaz (Tabela 4). Notavelmente, a TS a 60–65 °C demonstrou eficácia de inativação comparável ao processamento térmico convencional a 80 °C, indicando o seu potencial como uma alternativa eficiente para a produção de suco pós-biótico.

Tabela 4 – Inativação de *L. casei* B-442 (%), leveduras e bolores (UFC/mL), ácido ascórbico, atividade antioxidante (ABTS e FRAP) e concentrações de compostos fenólicos após 8 h de fermentação e diferentes métodos de processamento no suco de acerola fermentado.

Parâmetro	TS50	TS60	TS65	TH80
Inativação probiótica (%)	63,17 ^a	100 ^b	100 ^b	100 ^b
Leveduras e bolores (UFC/mL)	0 ^a	0 ^a	0 ^a	0 ^a
Ácido ascórbico (g/L)	2,78 ± 0,1 ^a	2,60 ± 0,1 ^a	2,60 ± 0,1 ^a	2,36 ± 0,1 ^b
Ácido láctico (g/L)	2,38 ± 0,1 ^a	2,25 ± 0,1 ^a	2,29 ± 0,1 ^a	2,22 ± 0,1 ^a
Compostos fenólicos (g/L)	1,42 ± 0,05 ^a	1,41 ± 0,05 ^a	1,46 ± 0,05 ^a	1,32 ± 0,05 ^b
ABTS (μmol trolox/L)	16.889 ± 281 ^a	16.516 ± 246 ^a	16.689 ± 249 ^a	13.382 ± 273 ^b
FRAP (μg Fe ²⁺ /mL)	2900 ± 180 ^a	2910 ± 160 ^a	2860 ± 130 ^a	2700 ± 180 ^b

Nota: TS50: termossonicado a 50 °C; TS60: termossonicado a 60 °C; TS65: termossonicado a 65 °C; TH80: processado termicamente a 80 °C. Letras diferentes na mesma linha indicam diferenças estatisticamente significativas ($p < 0,05$) pelo teste de Tukey.

Fonte: elaborada pelo autor (2026).

Alcántara-Zavala *et al.* (2021) relataram uma redução de 5,85 log UFC/mL de *Lactobacillus* sp. no pulque, uma bebida tradicional fermentada não láctea, utilizando termossonicação a 95% de amplitude (500 W) por 9 min a 50 °C. Por outro lado, Almada *et al.* (2021) observaram maior resistência ao ultrassom isolado (792 W; 20 kHz; temperatura ambiente) em *L. casei* e *L. acidophilus* (concentração inicial de 7 log UFC/mL), necessitando de um mínimo de 40 min para atingir uma redução > 5 ciclos logarítmicos em solução tampão fosfato. Embora a diferença nos tempos de inativação possa sugerir uma vantagem na associação do componente térmico, comparações diretas entre esses estudos exigem cautela. Como as condições operacionais do ultrassom (potência e amplitude) e a complexidade das matrizes (pulque versus solução tampão) diferem substancialmente, não é possível atribuir a maior eficiência exclusivamente à temperatura. Esses contrastes evidenciam, na verdade, a forte dependência da cinética de inativação em relação às variáveis específicas do equipamento e à composição da matriz avaliada.

Nenhum crescimento de leveduras e bolores foi observado nas amostras de suco

processadas por termossonicação e tratamento térmico convencional (Tabela 4). A termossonicação é um método antifúngico eficaz utilizado em sistemas de alimentos líquidos (ANAYA-ESPARZA *et al.*, 2017). O efeito sinérgico é particularmente útil contra esporos fúngicos resistentes ao calor, que são mais suscetíveis ao estresse mecânico induzido pelo ultrassom quando expostos a temperaturas subletais (EVELYN; MILANI; SILVA, 2017).

O processamento desempenha um papel crítico na produção de pós-bióticos, não apenas para a inativação de células microbianas, mas também para otimizar a liberação e preservação de compostos bioativos (NATARAJ *et al.*, 2020). Técnicas como o tratamento térmico e a termossonicação podem aumentar a disponibilidade de metabólitos-chave, incluindo peptídeos, ácidos orgânicos e componentes da parede celular, que contribuem para os efeitos de promoção da saúde dos pós-bióticos. Adicionalmente, o processamento garante a estabilidade, segurança e consistência do produto, essenciais para aplicações em escala industrial (PELUZIO; MARTINEZ; MILAGRO, 2021; PRAJAPATI *et al.*, 2023).

O principal mecanismo responsável pela inativação microbiana pelo ultrassom é conhecido como cavitação acústica. Esse fenômeno envolve a formação, o crescimento e a subsequente implosão de microbolhas dentro de um meio líquido submetido a oscilações ultrassônicas. O colapso dessas bolhas gera altas temperaturas e pressões localizadas, produzindo intensas forças mecânicas. Além disso, a corrente acústica – o fluxo constante de fluido resultante da dissipação de energia acústica durante a cavitação – também contribui para a inativação microbiana. Em conjunto, esses efeitos podem causar o rompimento da parede celular, a ruptura e o afinamento da membrana celular e danos a componentes intracelulares, incluindo o DNA, levando, em última análise, à perda da viabilidade microbiana (NUNES *et al.*, 2022; ZOU; JIANG, 2016).

Um mecanismo secundário que contribui para a inativação microbiana durante a termossonicação é a temperatura do processo. O aumento da temperatura de processamento eleva a pressão de vapor dentro das bolhas de cavitação, mitigando a intensidade do colapso e, simultaneamente, aumentando o número de bolhas formadas (OLIVEIRA *et al.*, 2022; JAFARPOUR, 2022). Na maioria dos estudos que combinam ultrassom com calor, as temperaturas de processamento são tipicamente brandas, variando de 30 °C a 70 °C (FAN *et al.*, 2022; MUÑOZ *et al.*, 2012), ilustrando o potencial da termossonicação para reduzir a intensidade dos tratamentos térmicos convencionais, mantendo a eficácia da inativação microbiana.

A termossonicação (TS: 50-65 °C) e o processamento térmico convencional (TH: 80 °C) preservaram efetivamente os compostos bioativos no suco de acerola fermentado, com mínimas diferenças estatísticas significativas observadas ($p < 0,05$). O teor de compostos fenólicos totais permaneceu entre 1,22 e 1,46 g/L, a retenção de ácido ascórbico variou de $2,36 \pm 0,10$ a $2,78 \pm 0,10$ g/L, e a atividade antioxidante – medida pelos ensaios ABTS e FRAP – foi mantida entre 16.516 ± 246 e 16.689 ± 249 $\mu\text{mol Trolox/L}$ e de 2860 ± 130 a 2910 ± 160 $\mu\text{g Fe}^{2+}/\text{mL}$, respectivamente (Tabela 4). Esses achados demonstram que ambos os tratamentos preservaram os compostos funcionais do suco com degradação mínima sob as condições testadas.

Tanto a termossonicação (60-65 °C) quanto o processamento térmico (80 °C) alcançaram a inativação completa do probiótico (redução $\geq 10,9$ ciclos logarítmicos), permitindo o desenvolvimento de uma bebida estável e potencialmente pós-biótica, evitando degradação significativa e garantindo a sua eficácia contínua (WU *et al.*, 2021; QIU *et al.*, 2024; XIA *et al.*, 2024).

3.3.4 Estabilidade do pós-biótico durante o armazenamento refrigerado

Para avaliar o impacto da termossonicação e dos tratamentos térmicos na estabilidade microbiana dos sucos de acerola pós-bióticos, a viabilidade de *L. casei*, leveduras e bolores foi monitorizada ao longo de 35 dias de armazenamento refrigerado.

Nenhum crescimento de *L. casei*, leveduras ou bolores foi observado durante o período de armazenamento nas amostras de suco de acerola fermentado tratadas com termossonicação e processamento térmico convencional (Tabela 5), indicando controle microbiano eficaz e prevenção da proliferação pós-processamento. A ação sinérgica da cavitação induzida pelo ultrassom e do calor brando provavelmente causou danos estruturais irreversíveis às células de *L. casei*, garantindo assim a estabilidade microbiana e a segurança ao longo da vida de prateleira do produto (QIU *et al.*, 2024).

Tabela 5 – Inativação de *L. casei* B-442 (%), leveduras e bolores (UFC/mL), glicose (g/L) e ácido láctico (g/L) durante o armazenamento refrigerado no suco de acerola fermentado pós-biótico.

Armazenamento a frio	Parâmetro	TS60	TS65	TH80
Dia 0	Inativação probiótica (%)	100 ^a	100 ^a	100 ^a
	Leveduras e bolores (UFC/mL)	0 ^a	0 ^a	0 ^a
	Glicose (g/L)	17,31 ± 0,5 ^a	16,19 ± 0,5 ^a	16,06 ± 0,5 ^a
	Ácido láctico (g/L)	2,25 ± 0,1 ^a	2,29 ± 0,1 ^a	2,22 ± 0,1 ^a
Dia 35	Inativação probiótica (%)	100 ^a	100 ^a	100 ^a
	Leveduras e bolores (UFC/mL)	0 ^a	0 ^a	0 ^a
	Glicose (g/L)	16,95 ± 0,5 ^a	15,88 ± 0,5 ^a	15,95 ± 0,5 ^a
	Ácido láctico (g/L)	2,30 ± 0,1 ^a	2,22 ± 0,1 ^a	2,22 ± 0,1 ^a

Nota: Letras diferentes indicam diferenças estatisticamente significativas ($p < 0,05$) entre o dia 0 e o dia 35 pelo teste de Tukey.

Fonte: elaborada pelo autor (2026).

A qualidade microbiana observada (não contaminação por leveduras e bolores) pode ser atribuída à presença de peptídeos antimicrobianos (PAMs) produzidos durante a fermentação e retidos após o processamento (SCUDINO *et al.*, 2024; PAVLOVA *et al.*, 2020). Esses compostos proteicos de baixo peso molecular, sintetizados por bactérias como o *L. casei*, exibem potente atividade antibacteriana contra uma variedade de microrganismos patogênicos e deteriorantes. O seu modo de ação geralmente envolve atingir as membranas celulares de cepas bacterianas intimamente relacionadas, levando ao rompimento celular e à morte (HE *et al.*, 2020).

A glicose e o ácido láctico permaneceram estáveis durante o armazenamento, conforme o esperado, dada a baixa temperatura e a ausência de microrganismos viáveis (Tabela 5). O ácido láctico é um dos ácidos orgânicos amplamente empregados na conservação de alimentos, sendo capaz de induzir danos letais ou subletais a microrganismos (antimicrobiano) modificando a permeabilidade da membrana celular externa (TIAN *et al.*, 2020). O teor de ácido láctico e glicose é constante em todas as

amostras de sucos pós-bióticos, sugerindo que quaisquer pequenas variações observadas sejam provavelmente atribuíveis à variabilidade experimental em vez das próprias condições de processamento.

Os níveis elevados de compostos fenólicos, atividade antioxidante e ácido ascórbico no suco de acerola revelam o seu potencial como ingrediente de alimento funcional, demonstrando as suas notáveis propriedades nutracêuticas e de promoção da saúde (PRAKASH; BASKARAN, 2018). A Tabela 6 apresenta as variações nos compostos fenólicos, ácido ascórbico e atividade antioxidante (ABTS e FRAP) no suco de acerola pós-biótico durante o armazenamento refrigerado. Tanto os sucos tratados por ultrassom quanto os tratados termicamente mantiveram estável o teor de fenólicos totais ao longo dos 35 dias de armazenamento (Tabela 6), começando com $1,32 \pm 0,05$ g/L no dia 0 e $1,48 \pm 0,05$ g/L no dia 35. Efeitos semelhantes dos tratamentos de termossônica nos compostos fenólicos totais foram relatados em vinho de mirtilo (LI *et al.*, 2020) e suco de mirtilo (WU *et al.*, 2021). Os tratamentos térmicos e de ultrassom podem levar a reações químicas, como a liberação de compostos fenólicos das suas conexões com vários componentes da parede celular, como polissacarídeos ou proteínas, que são então liberados ao longo do tempo (KWAW *et al.*, 2018; WANG; VANGA; RAGHAVAN, 2019).

Tabela 6 – Compostos fenólicos, ácido ascórbico e atividade antioxidante (ABTS e FRAP) durante o armazenamento refrigerado no suco de acerola fermentado pós-biótico.

Armazenamento a frio	Parâmetro	TS60	TS65	TH80
Dia 0	Compostos fenólicos (g/L)	$1,41 \pm 0,05^a$	$1,46 \pm 0,05^a$	$1,32 \pm 0,05^a$
	Ácido ascórbico (g/L)	$2,62 \pm 0,05^b$	$2,63 \pm 0,05^b$	$2,36 \pm 0,05^b$
	ABTS (μmol trolox/L)	16.516 ± 247^a	16.689 ± 249^b	13.382 ± 261^a
	FRAP ($\mu\text{g Fe}^{2+}$ /mL)	2910 ± 129^b	2860 ± 128^b	2850 ± 132^b
Dia 35	Compostos fenólicos (g/L)	$1,30 \pm 0,05^b$	$1,48 \pm 0,05^a$	$1,34 \pm 0,05^a$
	Ácido ascórbico (g/L)	$2,85 \pm 0,05^a$	$2,89 \pm 0,05^a$	$2,59 \pm 0,05^a$
	ABTS (μmol trolox/L)	16.896 ± 247^a	17.976 ± 249^a	13.956 ± 223^a
	FRAP ($\mu\text{g Fe}^{2+}$ /mL)	3180 ± 129^a	3200 ± 128^a	3090 ± 132^a

Nota: Letras diferentes indicam diferenças estatisticamente significativas ($p < 0,05$) entre o dia 0 e o dia 35 pelo teste de Tukey.

Fonte: elaborada pelo autor (2026).

O teor de ácido ascórbico permaneceu estável durante o período de armazenamento de 35 dias (Tabela 6). As concentrações finais variaram de $2,62 \pm 0,15$ a $2,85 \pm 0,15$ g/L para TS a 60 °C, de $2,63 \pm 0,15$ a $2,89 \pm 0,15$ g/L para TS a 65 °C, e de $2,36 \pm 0,15$ a $2,59 \pm 0,15$ g/L para TH a 80 °C. Essa observação é consistente com Aguilar *et al.* (2017), que demonstraram que a combinação de ultrassom com calor brando (55 °C) pode garantir a segurança microbiológica ao mesmo tempo em que preserva o teor de ácido ascórbico.

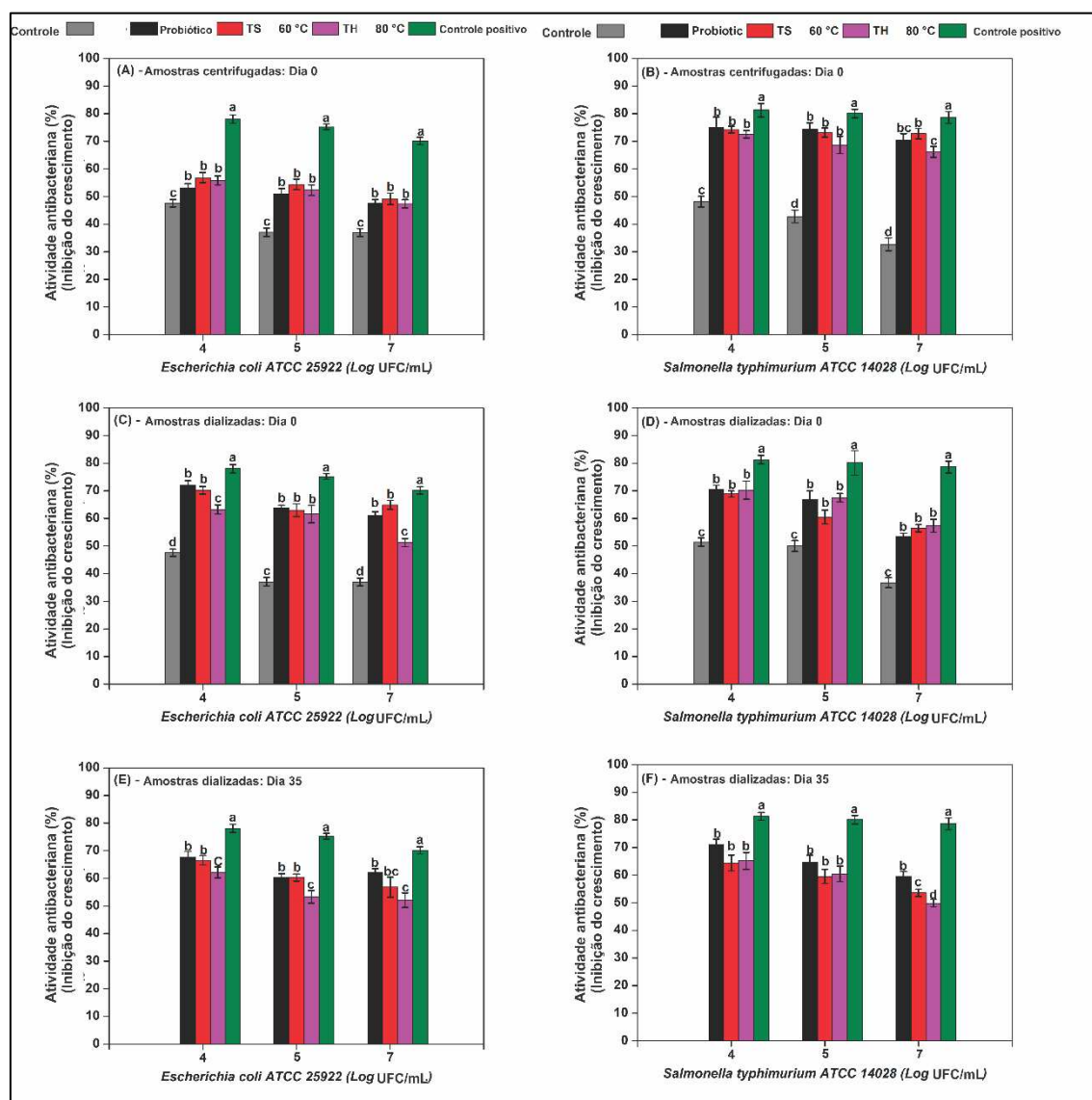
De forma consistente com os resultados para os compostos bioativos, a atividade antioxidante permaneceu estável durante o armazenamento em todas as amostras pós-bióticas (Tabela 6), começando de 13.516 ± 1261 a 17.976 ± 150 $\mu\text{mol Trolox/L}$ (ABTS) e de 2850 ± 80 a 3200 ± 80 $\mu\text{g Fe}^{2+}/\text{mL}$ (FRAP). A atividade antioxidante foi preservada durante o armazenamento refrigerado, conforme demonstrado pelos níveis estáveis mantidos ao longo deste período. Essa estabilidade pode ser atribuída à retenção de compostos fenólicos e de ácido ascórbico.

Esses achados demonstram que o suco de acerola pós-biótico produzido via termossonicação (60–65 °C) ou processamento térmico (80 °C) atinge a estabilidade microbiana aliada à preservação de seus compostos bioativos.

3.3.5 Atividade Antibacteriana

As bactérias lácticas e os seus metabólitos desempenham um papel significativo na garantia da segurança alimentar e no prolongamento da vida de prateleira através da inibição de microrganismos patogênicos e deteriorantes (ALGBOORY; MUHIALDIN, 2021; SZUTOWSKA, 2020; YANG *et al.*, 2018). A Figura 3 apresenta a atividade antibacteriana (% de inibição de crescimento) de sucos de acerola potencialmente pós-bióticos submetidos à termossonicação ($3300 \text{ W} \cdot \text{L}^{-1}$, 60 °C) e ao processamento térmico (80 °C) antes e após o armazenamento a 4 °C. Uma vez que o ácido láctico possui atividade antimicrobiana, uma amostra, controle positivo, contendo 3 g/L de ácido láctico também foi avaliada. A atividade antimicrobiana do suco de acerola, suco de acerola probiótico, suco de acerola pós-biótico e da amostra controle positivo são apresentadas na Figura 3.

Figura 3 – Atividade antibacteriana (% de inibição de crescimento) de sucos de acerola potencialmente pós-bióticos submetidos à termossonicação (3300 W·L⁻¹ a 60 °C) e ao processamento térmico (80 °C) antes e após o armazenamento a 4 °C



Nota: Atividade antimicrobiana de amostras centrifugadas contra (A) *E. coli* e (B) *S. Typhimurium* no dia 0; amostras dialisadas contra (C) *E. coli* e (D) *S. Typhimurium* no dia 0; amostras dialisadas contra (E) *E. coli* e (F) *S. Typhimurium* após 35 dias a 4 °C. O controle positivo é uma solução de ácido lático a 3 g/L. Letras diferentes indicam diferenças estatisticamente significativas entre os tratamentos (p < 0,05) pelo teste de Tukey.

Fonte: elaborada pelo autor (2026).

As amostras de sucos centrifugados (10.000 × g por 20 min a 4 °C) demonstraram forte inibição de crescimento contra *E. coli* e *S. Typhimurium* (% de atividade antibacteriana) (Figura 3A, B). O suco de acerola inibiu o crescimento de *E. coli* em 24% e o de *S. Typhimurium* em 32% (em 7 log UFC/mL). Esta redução no crescimento deve-

se, provavelmente, aos compostos bioativos encontrados no suco de acerola.

O suco de acerola probiótico melhorou a inibição de crescimento, atingindo 48% contra *E. coli* e 70% contra *S. Typhimurium* (em 7 log UFC/mL) (Figura 3A, B). Isso indica que o processo de fermentação produziu metabólitos com propriedades antibacterianas. Agentes antimicrobianos podem incluir bacteriocinas e ácidos orgânicos (ácido láctico, ácido acético, ácido fórmico, ácido caproico), ácidos graxos de cadeia curta (como ácido propiônico, ácido butírico e ácido isobutírico), dióxido de carbono, peróxido de hidrogênio, reuterina, reuterociclina e diacetil (INCILI *et al.*, 2022; CUI; QU, 2021). Neste trabalho, as propriedades antibacterianas foram provavelmente atribuídas a peptídeos antimicrobianos ou ao ácido láctico, uma vez que o *L. casei* é uma bactéria homofermentativa.

Os sucos pós-bióticos mantiveram a atividade antimicrobiana em níveis comparáveis aos do suco probiótico, indicando que o método de processamento preservou os compostos antibacterianos. O TS60 exibiu 49% e 73% de inibição contra *E. coli* e *S. Typhimurium* (em 7 log UFC/mL), respectivamente, enquanto o TH80 demonstrou 47% e 66% de inibição contra os mesmos patógenos na mesma concentração (Figura 3A, B). As amostras centrifugadas demonstraram uma atividade antimicrobiana mais forte contra *S. Typhimurium* em comparação com *E. coli*, sugerindo maior eficácia dos compostos inibitórios contra espécies de *Salmonella*.

Esses achados são consistentes com pesquisas anteriores, demonstrando que a fermentação aumenta a atividade antimicrobiana de produtos contendo probióticos. Muhialdin *et al.* (2021) relataram que uma fermentação de 48 h aumentou significativamente a atividade antibacteriana de suco de melão fermentado usando *L. plantarum* FBS05 contra 10^6 UFC/mL de *E. coli* e *S. Typhimurium* para $96,73 \pm 0,00\%$ e $96,83 \pm 0,00\%$, respectivamente. Algboory e Muhialdin (2021) relataram que uma fermentação de 48 h aumentou a atividade antibacteriana do leite de camela fermentado usando *L. plantarum* IS10 contra 10^6 UFC/mL de *E. coli* e *S. aureus* subsp. *aureus* para 75% e 79%, respectivamente.

Para garantir que o efeito antibacteriano dos sucos não provinha apenas do ácido láctico produzido durante a fermentação, foi realizada uma diálise para remover o ácido láctico das amostras de sucos centrifugados, conforme confirmado por análise de HPLC, permitindo assim a avaliação dos efeitos antibacterianos decorrentes de outros constituintes bioativos. Conforme demonstrado nas Figuras 3C e D, as amostras dialisadas (24 h usando membranas de limite de exclusão molecular de 12 kDa em água

destilada) mantiveram efetivamente a atividade antibacteriana contra *E. coli* e *S. Typhimurium*.

O processo de diálise melhorou consistentemente a atividade anti-*E. coli* em todas as amostras (probiótico: +12%; TS60: +16%; TH80: +4%) (Figura 3C), enquanto também reduziu a eficácia anti-*Salmonella* (probiótico: -20%; TS60: -17%; TH80: -9%) (Figura 3D) em comparação com as amostras centrifugadas (em 7 log UFC/mL). Esses achados indicam a presença de compostos antimicrobianos adicionais além do ácido láctico – potencialmente incluindo peptídeos bioativos que contribuem para o efeito inibitório (ALGBOORY; MUHIALDIN, 2021; ÎNCILI *et al.*, 2022; LI *et al.*, 2016).

Além disso, os pós-bióticos produzidos por processamento térmico a 80 °C foram menos eficazes contra *E. coli* quando comparados ao probiótico e aos pós-bióticos produzidos por termossonicação a 60 °C ($p < 0,05$) (Figura 3C). Majkut *et al.* (2021) relataram que o mel submetido a tratamento térmico apresentou uma redução significativa das propriedades antimicrobianas ($MBC \geq 50\%$) a 82 °C e 62 °C após 15 e 120 minutos de exposição.

A atividade antimicrobiana de sucos dialisados deve-se provavelmente à presença de peptídeos antimicrobianos, sendo as bacteriocinas um dos mais conhecidos (ULLAH *et al.*, 2017). Esses compostos exercem os seus efeitos interrompendo a integridade das membranas celulares das bactérias-alvo, formando poros que levam ao vazamento celular, à perda do potencial de membrana e, finalmente, à morte celular. Em alguns casos, as bacteriocinas também podem interferir em sistemas enzimáticos essenciais ou inibir a síntese de proteínas (XUE *et al.*, 2024).

A eficácia antibacteriana dessas bacteriocinas é particularmente valiosa na conservação de alimentos, pois inibem patógenos comuns de origem alimentar, como *L. monocytogenes*, *S. aureus* e certas cepas de *E. coli* e *Salmonella*. Além disso, como as bacteriocinas são produzidas naturalmente e geralmente reconhecidas como seguras (GRAS), oferecem uma alternativa promissora a conservantes sintéticos e antibióticos (LIANG *et al.*, 2025).

A estabilidade dos sucos durante o armazenamento refrigerado é um aspecto crítico para garantir a vida de prateleira do produto. Neste estudo, a atividade antimicrobiana foi avaliada após 35 dias de armazenamento refrigerado a 4 °C para garantir o efeito antibacteriano dos sucos após esse período.

A atividade antibacteriana foi mantida após 35 dias de armazenamento (Figura 3E, F). O suco probiótico manteve taxas de inibição estáveis contra ambos os patógenos em

7 log UFC/mL: 62% (vs. 61% em amostras dialisadas no dia 0) para *E. coli* e 59% (vs. 53% em amostras dialisadas no dia 0) para *S. Typhimurium*, demonstrando uma eficácia consistente ao longo do tempo (Figura 3E, F). Essa eficácia prolongada pode ser explicada pela atividade contínua de fermentação do *L. casei* durante o armazenamento a frio, uma vez que a cepa permanece metabolicamente ativa em baixas temperaturas, gerando potencialmente compostos antimicrobianos adicionais (ex.: bacteriocinas) ao longo de 35 dias (FILHO *et al.*, 2019; MACIEL; CAMPELO; RODRIGUES, 2022).

Os sucos pós-bióticos (TS60 e TH80) retiveram atividade antibacteriana significativa após 35 dias de armazenamento, demonstrando notável estabilidade apesar de pequenas reduções na eficácia. O TS60 manteve 57% de inibição contra *E. coli* (vs. 65% inicialmente) e 54% contra *S. Typhimurium* (vs. 56% inicialmente), representando apenas 8-12% de perda de atividade. O TH80 apresentou uma estabilidade ainda maior contra *E. coli* (53% vs. 51% inicialmente), com uma redução de 7% contra *S. Typhimurium* (50% vs. 57%) (Figura 3E, F). Esses resultados indicam que a atividade antibacteriana permanece efetiva nos sucos por até 35 dias com algumas reduções.

As bacteriocinas das bactérias lácticas exibem excepcional termoestabilidade e tolerância a ácidos, o que as torna candidatas ideais para a conservação de alimentos (DARBANDI *et al.*, 2022). Exemplos notáveis incluem a pentocina TV35b, a enterocina A5-11 e a bacteriocina EF2019, juntamente com as bacteriocinas produzidas por cepas intestinais de *Pediococcus* e *Lactococcus* spp. Estes peptídeos antimicrobianos demonstram notável estabilidade sob condições de processamento, mantendo a bioatividade (BARBOSA; MANTOVANI; JAIN, 2017).

3.4 Conclusão

Este estudo demonstrou a viabilidade de produzir uma bebida pós-biótica não láctea, estável e funcional a partir do suco de acerola fermentado com *L. casei* B-442. Tanto a termossonicação (TS) quanto o processamento térmico (TH) inativaram efetivamente a cepa probiótica (redução $\geq 10,9$ ciclos logarítmicos), preservando e aprimorando compostos bioativos-chave. Os sucos tratados com termossonicação (TS, 60-65 °C) demonstraram retenção superior de ácido ascórbico, teor de compostos fenólicos totais e atividade antioxidante em comparação com a pasteurização térmica convencional. Esses parâmetros bioativos permaneceram estáveis ao longo de 35 dias de armazenamento refrigerado a 4 °C.

Notavelmente, os sucos pós-bióticos exibiram atividade antibacteriana significativa contra *E. coli* e *S. Typhimurium*, a qual permaneceu estável ao longo dos 35 dias de armazenamento a frio. Entre os métodos testados, a termossonicação a 60 °C emergiu como a estratégia mais promissora devido à sua preservação superior de compostos bioativos, eficácia antimicrobiana sustentada e potencial para escalabilidade industrial eficiente. Estes achados corroboram o potencial da termossonicação para o desenvolvimento de bebidas pós-bióticas à base de frutas, resultando em produtos alinhados ao conceito de rótulo limpo (*clean-label*), com boa estabilidade comercial e propriedades promotoras de saúde.

4 TIPO DE REATOR IMPACTA A CINÉTICA DE INATIVAÇÃO POR TERMOSSONICAÇÃO DE *LACTICASEIBACILLUS CASEI* EM BEBIDA POTENCIALMENTE PÓS-BIÓTICA DE LARANJA

RESUMO

Os pós-bióticos oferecem benefícios à saúde e estabilidade superior em comparação aos probióticos viáveis. Este estudo investigou a cinética de inativação de *Lacticaseibacillus casei* em uma bebida de laranja fermentada, comparando a termossonicação (TS) com a inativação térmica convencional (TH) a 50, 55 e 60 °C. A pesquisa concentrou-se na influência do tipo de reator (suas propriedades acústicas de material, confinamento espacial e frequência de operação) sobre a cinética de inativação. Enquanto a TH seguiu consistentemente uma cinética linear de primeira ordem (modelo de Bigelow), a cinética da TS foi fortemente influenciada pelo ambiente físico do reator. Em uma câmara confinada de aço inoxidável, a TS induziu uma inativação não linear de Weibull com um efeito de cauda resistente (*tailing*). Isso pode ser atribuído à diferença de impedância acústica e à rugosidade superficial do material, fatores conhecidos na literatura por potencialmente promoverem a formação de ondas estacionárias e atenuação de fronteira. Em contrapartida, levanta-se a hipótese de que a transição para reatores de vidro maiores facilita um escoamento acústico (*acoustic streaming*) macroscópico vigoroso e uma distribuição homogênea de energia. Isso resultou em uma inativação linear robusta e altamente previsível ($R^2 > 0,99$), mitigando efetivamente a sobrevivência de subpopulações. A abordagem de TS mais eficiente (reator de vidro a 60 °C, 10 W/mL) alcançou um valor D de 0,62 min, reduzindo o tempo de processamento em 57% quando comparado ao processamento térmico. Com base nessas cinéticas, propõem-se três cenários de processamento otimizados (TS isotérmica, híbrida e homogênea) para garantir a segurança do produto. Por fim, este estudo indicou que o tipo de reator (incluindo as propriedades acústicas do seu material, frequência de operação e propriedades topográficas) pode mitigar não linearidades cinéticas, estabelecendo assim a termossonicação homogênea como uma tecnologia rápida, previsível e viável para o escalonamento (*scale-up*) industrial da produção de pós-bióticos.

Palavras-chave: Ultrassom; Escoamento acústico; Reator confinado; Modelagem cinética; Pós-bióticos; *Lactobacillus casei*; Escalonamento.

4.1 Introdução

As bactérias lácticas (BAL) são fundamentais para a indústria de alimentos, desempenhando um papel central nos processos de fermentação, nos quais seus subprodutos metabólicos melhoram o sabor, o valor nutricional e a vida de prateleira (HAJAR-AZHARI *et al.*, 2023; KARDOONI *et al.*, 2023). Entre elas, o *Lactocaseibacillus casei* (anteriormente *Lactobacillus casei*) é uma bactéria probiótica heterofermentativa facultativa, Gram-positiva e bem estudada, encontrada em vários ambientes, incluindo produtos fermentados e o trato gastrointestinal humano (CUI; QU, 2021). Esta bactéria tem sido amplamente empregada em formulações de bebidas probióticas devido às suas características robustas de sobrevivência e aos seus potenciais benefícios à saúde (ALMADA *et al.*, 2021; BRANDÃO *et al.*, 2021).

As tendências recentes em alimentos funcionais expandiram-se para além dos probióticos viáveis, incluindo o uso de probióticos inativados, conhecidos como pós-bióticos (FANG *et al.*, 2024; PRAJAPATI *et al.*, 2023). Os pós-bióticos são definidos como microrganismos inanimados e/ou seus componentes que conferem benefícios à saúde do hospedeiro (SALMINEN *et al.*, 2021). Eles oferecem vantagens distintas sobre os probióticos viáveis através de uma maior estabilidade de armazenamento e da redução dos requisitos de refrigeração (GARROTE ACHOU *et al.*, 2025; JANSSEUNE *et al.*, 2025). Para aproveitar ao máximo essas vantagens, a escolha do método de inativação é crítica, pois influencia diretamente a retenção dos benefícios à saúde e a preservação dos atributos sensoriais do produto (JANSSEUNE *et al.*, 2025).

O processamento térmico (TH) continua sendo a técnica padrão de conservação, tipicamente aplicada a temperaturas que variam de 65 a 95 °C para sucos de frutas (AGHAJANZADEH *et al.*, 2023; HOLDSWORTH; SIMPSON, 2016). Embora seja eficaz para o controle microbiano, o processamento térmico pode degradar compostos nutricionais e bioativos sensíveis ao calor em virtude das altas temperaturas e dos tempos de exposição prolongados (JAFARPOUR, 2022; WIBOWO *et al.*, 2025). Impulsionada pela demanda por eficiência de processamento e retenção de qualidade, a tecnologia de ultrassom tem surgido como uma alternativa promissora para a produção de bebidas funcionais (SULAIMAN; SILVA, 2026; FONTELES *et al.*, 2024; HASHEMI *et al.*, 2023). O ultrassom inativa microrganismos por meio de mecanismos como cavitação, agitação mecânica, formação de radicais livres e aumento da permeabilidade celular (LAUTERI *et al.*, 2023). No entanto, o ultrassom isolado à temperatura ambiente

frequentemente se mostra insuficiente para atingir os níveis de redução microbiana exigidos e comparáveis aos da pasteurização térmica (BERMUDEZ-AGUIRRE; NIEMIRA, 2022; NUNES *et al.*, 2022).

Consequentemente, a termossonicação (TS) – a aplicação simultânea de ultrassom com calor brando – representa uma tecnologia sinérgica cientificamente validada e altamente eficaz (OLIVEIRA *et al.*, 2022; SOTELO-LARA *et al.*, 2024). Ela aumenta a segurança microbiana enquanto auxilia na preservação da qualidade do produto por meio da redução da exposição térmica (ABDULSTAR *et al.*, 2023; MÜLDÜR *et al.*, 2025). Estudos anteriores demonstraram a eficácia geral do ultrassom na inativação de espécies de *Lactobacillus*. Por exemplo, Brandão *et al.* (2021) alcançaram uma redução de 9 ciclos logarítmicos (log UFC/mL) em uma suspensão de *L. casei* utilizando um disruptor celular (20 kHz, 792 W, 40 min). De forma semelhante, Alcántara-Zavala *et al.* (2021) obtiveram com sucesso uma redução de 7,21 ciclos logarítmicos de cepas de *Lactobacillus* (*L. kefir*, *L. acidophilus* e *L. hilgardii*) em uma bebida fermentada mexicana – aplicando termossonicação (20 kHz, 500 W a 95% de amplitude, 50 °C, 9 min).

Além disso, a termossonicação oferece uma vantagem mecânica distinta sobre outras tecnologias emergentes para a produção de pós-bióticos. Enquanto o aquecimento ôhmico proporciona uma inativação rápida, porém puramente térmica, e tecnologias como o Processamento por Alta Pressão (HPP) ou os Campos Elétricos Pulsados (PEF) induzem primariamente a desnaturação macromolecular e a eletroporação – muitas vezes deixando a robusta parede celular das bactérias Gram-positivas amplamente intacta (ALMADA *et al.*, 2021; SHIN *et al.*, 2025), a termossonicação aplica um intenso cisalhamento mecânico. O colapso violento das bolhas de cavitação acústica rompe fisicamente o espesso envelope de peptidoglicano do *L. casei* (NUNES *et al.*, 2022). Esta ação termomecânica sinérgica não apenas acelera a inativação microbiana, mas simultaneamente promove a liberação de valiosos compostos bioativos intracelulares na matriz da bebida, uma etapa crítica para maximizar o potencial funcional dos produtos pós-bióticos (PRAJAPATI *et al.*, 2023; SALMINEN *et al.*, 2021).

Atualmente, a maior parte da literatura sobre a cinética de inativação microbiana por termossonicação concentra-se primariamente nos parâmetros de processo (ex.: tempo, temperatura e densidade de potência). Embora avanços recentes tenham começado a explorar a hidrodinâmica dos reatores, a modelagem de fluidodinâmica computacional (CFD) do escoamento acústico em reatores confinados e a dinâmica de interação de

bolhas (CHEN *et al.*, 2023; HASHEMI *et al.*, 2024; QIN *et al.*, 2024), ainda persiste uma lacuna crítica na abordagem dos fatores físicos relacionados ao próprio reator durante a inativação microbiana. Fatores como o confinamento físico do campo acústico, a razão altura/volume do líquido e o material do reator (CHAKRABORTY *et al.*, 2025; KEWALRAMANI *et al.*, 2023; LIM *et al.*, 2014), bem como o seu efeito na cinética de inativação, carecem de maior investigação. Isso é particularmente importante para a indústria de alimentos, onde as transições entre escalas e tipos de recipientes de processamento frequentemente resultam em mudanças cinéticas inesperadas, levando a uma redução microbiana imprevisível (GOGATE; PANDIT, 2004; SON *et al.*, 2011).

O objetivo deste estudo foi modelar e comparar a cinética de inativação térmica (TH) e por termossonicação (TS) do *Lactocaseibacillus casei* em uma bebida de laranja fermentada. Especificamente, este trabalho avalia a influência de parâmetros relacionados ao reator – como as propriedades acústicas do material, o confinamento espacial e a densidade de potência – sobre a cinética de inativação a 50, 55 e 60 °C. O efeito da termossonicação nos atributos físico-químicos e nos compostos bioativos da bebida foi previamente investigado pelo nosso grupo (NASCIMENTO *et al.*, 2025).

4.2 Materiais e métodos

4.2.1 Suco de laranja

Este estudo foi conduzido em dois países diferentes. O néctar de laranja foi adquirido no comércio local (Laranjas do Algarve Compal®, Lisboa, Portugal), e o suco de laranja integral foi adquirido da marca Natural One (Fortaleza, Brasil). O néctar continha, no mínimo, 50% de teor de fruta e 10 g/100 mL de sacarose. Desse modo, o suco de laranja 100% integral adquirido no Brasil foi primeiramente filtrado e diluído para se igualar ao teor de 50% de fruta do néctar base. Em seguida, seu teor de sólidos solúveis foi padronizado com sacarose para 10 g/100 mL. Tais padronizações físico-químicas – combinadas ao idêntico ajuste inicial de pH – foram implementadas para minimizar a variabilidade composicional geográfica inerente entre as matrizes, assegurando um ambiente reológico e químico consistente para a modelagem cinética comparativa.

4.2.2 Preparo e enumeração do *Lacticaseibacillus casei*

O *Lacticaseibacillus casei* (anteriormente *Lactobacillus casei*) NRRL B-442 foi obtido da Coleção de Culturas NRRL (Departamento de Agricultura dos Estados Unidos, Peoria, Illinois, EUA). A cultura de estoque de *L. casei* NRRL B-442 foi ativada em caldo MRS (30 °C, 16 h) para obter uma concentração celular inicial de aproximadamente 9,0 log UFC/mL.

Para a quantificação da enumeração celular, duas técnicas de plaqueamento foram empregadas de forma complementar. Na técnica de microgotas (HERIGSTAD; HAMILTON; HEERSINK, 2001), um total de 10 µL de cada diluição seriada foi inoculado em placas de ágar MRS (divididas em quatro quadrantes), estabelecendo-se um limite de detecção teórico de 2,0 log UFC/mL (100 UFC/mL). Adicionalmente, empregou-se a técnica de espalhamento em superfície (*spread plate*) (TAYLOR *et al.*, 1983), na qual um volume de 100 µL da amostra foi espalhado uniformemente sobre o ágar MRS, propiciando um limite de detecção mais sensível, correspondente a 1,0 log UFC/mL (10 UFC/mL). Todas as placas foram preparadas em triplicata, enumerando-se apenas as diluições que apresentaram contagens dentro das faixas estatisticamente recomendadas para cada técnica, de modo a garantir a confiabilidade dos resultados.

4.2.3 Fermentação do suco de laranja

Devido ao seu baixo pH (aproximadamente 3,2 – 3,5), o suco e o néctar de laranja foram ajustados para pH 5,0 utilizando NaOH 1 M antes da fermentação. Esse ajuste visa garantir condições favoráveis de crescimento para o *L. casei* (pH 5,0–6,5) e simula aquelas tipicamente empregadas na produção de bebidas probióticas. A fermentação foi conduzida em frascos Schott estéreis (500 mL) contendo 400 mL de néctar inoculado com 1% (v/v) da cultura ativada de *Lacticaseibacillus casei*. O processo ocorreu a 30 °C por 24 h, sem agitação. Este ajuste inicial constituiu um pré-requisito biotecnológico indispensável para viabilizar um crescimento microbiano robusto. Durante as 24 horas de fermentação, a intensa produção de ácido láctico e outros metabólitos pelo *L. casei* reduziu naturalmente o pH de volta a aproximadamente 3,8. Consequentemente, a elevação transitória inicial do pH é totalmente suplantada pela fermentação, que transforma fundamentalmente a bebida em um novo produto funcional, com um perfil sensorial ácido

e fermentado distinto e característico.

4.2.4 Experimentos de inativação térmica

A inativação térmica foi realizada em três temperaturas diferentes: 50, 55 e 60 ± 2 °C. Essas temperaturas foram escolhidas de acordo com os valores D encontrados na literatura para *Lacticaseibacillus* (Almada *et al.*, 2021; Evelyn; Silva, 2015) e para representar condições de pasteurização leves a moderadas. Dois experimentos isotérmicos de sobrevivência independentes foram conduzidos em cada temperatura, com durações variando de 9 a 50 min, dependendo da temperatura do experimento isotérmico e da sobrevivência microbiana ao longo do tempo.

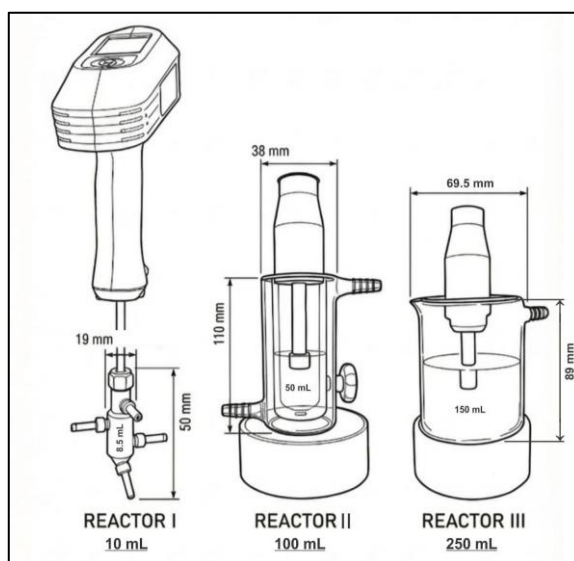
O número total de réplicas em todas as combinações de tempo e temperatura foi $n = 6$ (dois experimentos independentes × três réplicas técnicas). Foi utilizada uma câmara de aço de 10 mL (19 mm x 50 mm) contendo 8,5 mL de néctar de laranja fermentado esterilizado, envolvida por uma camisa de água conectada a um banho-maria de circulação termostática (Thermomix BU, Braun, Alemanha). Após a temperatura alvo ser atingida, foram adicionados 500 µL de inóculo de *L. casei*. A contagem microbiana inicial no tempo zero foi determinada recolhendo-se uma amostra de 100 µL. Em intervalos de tempo designados, amostras de 100 µL foram coletadas, diluídas e plaqueadas para enumeração microbiana, conforme descrito na Seção 2.2.

4.2.5 Experimentos de inativação por termossonicação

Os tratamentos por termossonicação foram conduzidos na bebida de laranja fermentada por *L. casei* utilizando três tipos diferentes de reatores. O objetivo foi avaliar a influência crítica das características globais do reator — englobando as propriedades acústicas do material, o volume de trabalho, o confinamento espacial e a frequência de operação — sobre a cinética de inativação, conforme esquematizado na Figura 1. Essa comparação entre múltiplos reatores destaca-se como um diferencial estratégico deste estudo, buscando preencher uma lacuna industrial na compreensão dos efeitos específicos do material, do tamanho e do confinamento do reator, bem como da razão entre o volume do recipiente e o volume da bebida, na inativação microbiana.

Figura 1 – Representação esquemática dos reatores de termossonicação utilizados.

Reator I: Câmara confinada de aço inoxidável (capacidade total de 10 mL), com volume de trabalho de 8,5 mL de bebida fermentada, acoplada a um sonotrodo de 7 mm. **Reator II:** Reator de vidro (capacidade total de 100 mL), com volume de trabalho de 50 mL de bebida fermentada, utilizando uma macrossonda de 13 mm. **Reator III:** Reator de vidro maior (capacidade total de 250 mL), com volume de trabalho de 150 mL de bebida fermentada, utilizando uma macrossonda de 13 mm.



Nota: As dimensões internas (diâmetro × altura) e os volumes de bebida tratada estão indicados diretamente na imagem. Todos os reatores eram encamisados, permitindo a circulação de água a partir de um banho-maria termostático para o controle de temperatura, sem que houvesse contato da água com a bebida.

Fonte: elaborada pelo autor (2026).

Para fornecer uma base precisa na avaliação desses efeitos físicos, os materiais específicos, as dimensões e os volumes de processamento de cada reator são detalhados a seguir:

- **Reator I (Câmara de Aço Confinada):** Consistiu em uma câmara confinada de aço inoxidável com capacidade total de 10 mL e dimensões internas de 19 mm (diâmetro) × 50 mm (altura). O volume da amostra sonicada foi de 8,5 mL. Este reator foi operado utilizando um equipamento de 26 kHz munido de um sonotrodo de titânio de 7 mm (Modelo UP200Ht, Hielscher, Alemanha).
- **Reator II (Reator de Vidro):** Consistiu em um reator de vidro encamisado com capacidade total da câmara de 100 mL e dimensões internas de 38 mm (diâmetro) × 110 mm (altura). O volume da amostra sonicada foi de 50 mL. O processamento

foi realizado utilizando um equipamento de 18 kHz equipado com um sonotrodo de titânio de 13 mm (Modelo USD500, Ultrasonique, Brasil).

- **Reator III (Reator de Vidro Maior):** Utilizou o mesmo sistema ultrassônico de 18 kHz, porém acoplado a um reator de vidro encamisado de maior porte, com capacidade total da câmara de 250 mL e dimensões internas de 69,5 mm (diâmetro) × 89 mm (altura). O volume da amostra sonicada foi triplicado, passando para 150 mL.

Na câmara de aço inoxidável confinada (Reator I), a ponta do sonotrodo foi submersa na bebida e posicionada logo acima do centro geométrico do reator. Em contraste, para ambos os recipientes de vidro (Reatores II e III), a ponta foi imersa 15 mm abaixo da superfície do líquido.

Para todos os reatores avaliados, a temperatura foi regulada por meio de um banho-maria termostático de circulação conectado aos recipientes de parede dupla. A termossonicação (TS) foi aplicada em densidades de potência acústica padronizadas de 3 e 10 W/mL nas temperaturas de 50, 55 e 60 ± 2 °C, a depender do experimento. O processamento por ultrassom foi iniciado somente após a bebida atingir a temperatura-alvo. Imediatamente após o tratamento, as amostras foram coletadas e arrefecidas a 4 °C em banho de gelo para cessar os efeitos térmicos, conforme descrito por Nascimento *et al.* (2025).

Para contrapor o intenso calor localizado gerado continuamente pela cavitação acústica, os tratamentos foram conduzidos utilizando reatores encamisados com *design* adaptado, conectados a um banho termostático de circulação externo. Esse sistema de resfriamento ativo foi empregado com o intuito de manter a matriz o mais próximo possível das condições isotérmicas-alvo durante todo o processo de termossonicação. A tolerância declarada de ± 2 °C para as temperaturas-alvo (50–60 °C) reflete a variabilidade operacional observada entre as réplicas biológicas independentes, em virtude dos desafios inerentes de parear o resfriamento ativo externo com o intenso calor localizado gerado pela cavitação ao longo das diferentes bateladas experimentais.

A Densidade de Potência Acústica (DPA, expressa em W/mL) foi determinada medindo-se a potência real consumida pelo equipamento durante o processo de sonicação ativa (W), dividida pelo volume total da amostra processada (mL), conforme a Equação 1:

$$DPA = \frac{\text{Potência consumida (W)}}{\text{Volume (mL)}} \quad (1)$$

A densidade de potência elétrica real atuou como um indicador (*proxy*) altamente reprodutível. Esses valores aferidos foram validados de forma cruzada e mostraram-se consistentes com as potências nominais descritas no manual do fabricante para meios aquosos. Essa padronização foi mantida com o intuito de avaliar os efeitos macroscópicos da geometria do reator e do confinamento espacial sob aportes de energia equivalentes.

4.2.6 Modelagem matemática

A modelagem matemática da inativação microbiana foi realizada utilizando os *softwares* Microsoft Excel e TableCurve 2D v5.01. Dois modelos foram aplicados para descrever a inativação de *L. casei* com base nas características das curvas de sobrevivência (Log (N/N₀) *versus* tempo): o Modelo de Bigelow (linear) e o Modelo de Weibull (não linear). Esses modelos específicos foram selecionados estrategicamente para capturar os distintos comportamentos macroscópicos observados, sem redundância matemática. O modelo de Bigelow fornece os parâmetros cinéticos clássicos essenciais (valores D e Z) requeridos para o *benchmarking* térmico industrial, ao passo que a distribuição de Weibull oferece a flexibilidade necessária para descrever de maneira robusta as complexas anomalias não lineares (como os efeitos de cauda) frequentemente associadas à cavitação acústica.

4.2.6.1 Modelo de Bigelow

O modelo de Bigelow foi aplicado aos dados de inativação térmica (TH) e de termossonicação obtidos nos reatores II e III (reatores de vidro), nos quais as curvas de sobrevivência exibiram uma cinética de primeira ordem. Este modelo consiste em uma abordagem clássica para descrever a cinética de letalidade microbiana (BIGELOW, 1921). O tempo de redução decimal (valor D) representa o tempo necessário para uma redução de 10 vezes (um ciclo logarítmico) na população microbiana a uma dada temperatura. Ele é calculado como o inverso negativo do coeficiente angular da reta, utilizando a Equação 2:

$$\text{Log} \left(\frac{N}{N_0} \right) = -\frac{t}{D} \quad (2)$$

Em que N_0 é a concentração inicial de *L. casei* (UFC/mL), N é a concentração no tempo t (min), e o valor D é o tempo de redução decimal à temperatura T (°C).

O coeficiente de temperatura, valor Z (°C), representa o incremento de temperatura necessário para promover uma redução de 10 vezes no valor D , sendo calculado por meio da Equação 3:

$$\text{Log} \left(\frac{D}{D_{ref}} \right) = \frac{T_{ref} - T}{z} \quad (3)$$

Onde D_{Tref} é o valor D na temperatura de referência (T_{ref} , que pode ser qualquer temperatura de referência escolhida, °C), e T é a temperatura do tratamento isotérmico (°C).

4.2.6.2 Modelo de Weibull

Os dados de termossonicação obtidos no reator I (câmara de aço inoxidável) exibiram curvas de sobrevivência não lineares e foram modelados usando a distribuição de Weibull. Essa abordagem considera processos de inativação complexos onde a taxa de mortalidade não é constante (WEIBULL, 1951). O modelo de Weibull foi selecionado devido à sua flexibilidade na descrição da heterogeneidade biológica e à taxa de morte não constante induzida pelos efeitos combinados do calor e do ultrassom de alta intensidade na câmara confinada (PANARO *et al.*, 2024). A sobrevivência probiótica foi calculada usando a Equação 4:

$$\text{Log} \left(\frac{N}{N_0} \right) = -bt^n \quad (4)$$

Onde N é a população microbiana (UFC/mL) no tempo t (min); N_0 é a população microbiana inicial; b é o fator de escala (tempo⁻ⁿ) relacionado à taxa de inativação; e n é o fator de forma (adimensional). Valores de $n < 1$ indicam curvas de concavidade para cima (efeito de cauda), enquanto $n > 1$ indicam curvas de concavidade para baixo (efeito de ombro).

4.2.7 Avaliação do modelo e estatística

O *software* TableCurve 2D versão 5.01 (SYSTAT Software Inc., EUA) foi utilizado para ajustar o modelo apropriado aos dados de sobrevivência e estimar os

parâmetros. A qualidade do ajuste foi avaliada por meio do coeficiente de determinação (R^2 , com valores tendendo a 1,00) e do Erro Quadrático Médio (MSE, do inglês *Mean Square Error*, tendendo a 0,00). Os parâmetros cinéticos (valor D para Bigelow; b e n para Weibull) foram determinados por meio de análise de regressão não linear.

Todos os experimentos foram replicados, e todas as contagens microbianas foram realizadas em duplicata ($n = 4$ por ponto de amostragem). Os resultados são apresentados como média $\pm$ desvio padrão (DP), derivados de dois experimentos independentes. Como a sobrevivência microbiana foi monitorada ao longo de múltiplos intervalos temporais de amostragem, cada modelo de regressão cinética foi, em última análise, ajustado a um número substancial de pontos de dados (um mínimo de 12 pontos para cada temperatura). Esse elevado grau de liberdade assegurou a robustez estatística dos parâmetros derivados, o que foi corroborado pelos altos valores de R^2 e baixos valores de MSE. Além disso, a análise de resíduos foi sistematicamente avaliada para todas as regressões, a fim de confirmar a homoscedasticidade e garantir a total ausência de viés sistemático nas curvas preditas. A incerteza estatística dos parâmetros cinéticos estimados foi rigorosamente quantificada e expressa como desvios padrão (DP) ou erros padrão (EP) nas respectivas tabelas.

4.3 Resultados e discussão

Para comparar as eficiências de processamento, a cinética de inativação de *Lactocaseibacillus casei* foi modelada para todas as condições experimentais. A depender do comportamento das curvas de sobrevivência oriundas dos tratamentos térmico e por termossônica nos diferentes tipos de reatores, os dados foram ajustados empregando-se o modelo linear de primeira ordem (Bigelow) ou o modelo não linear de Weibull.

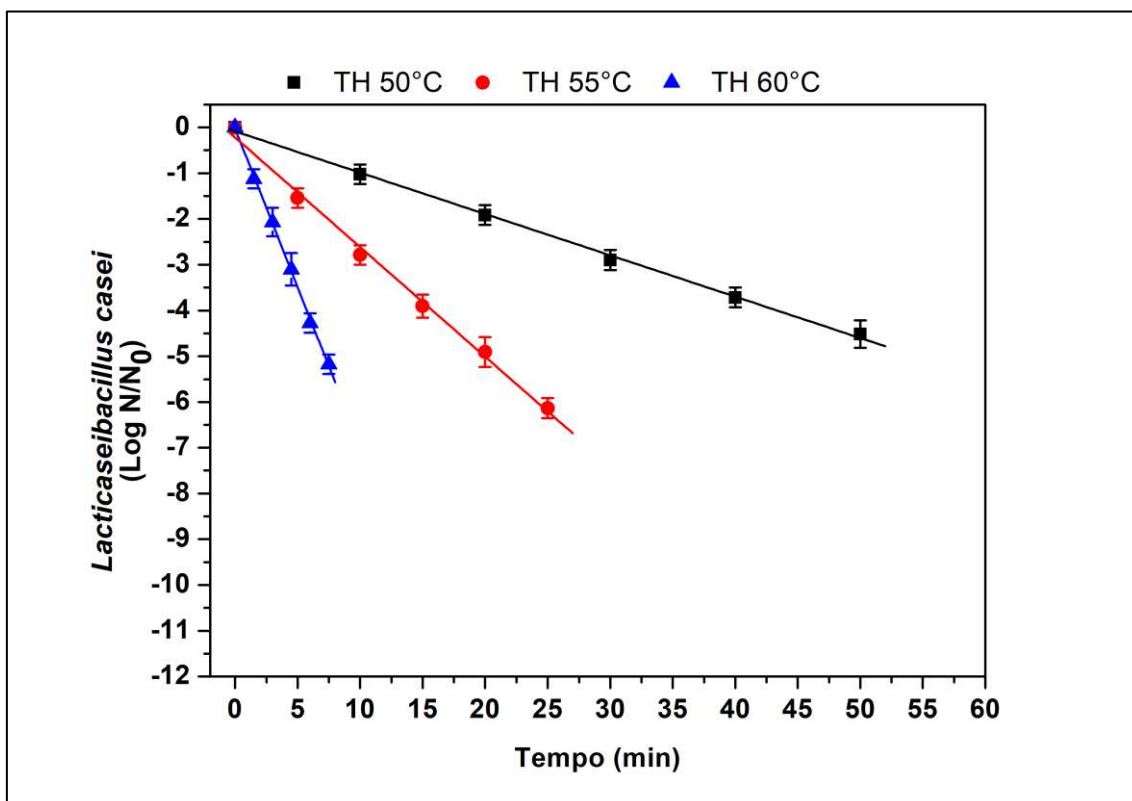
4.3.1 Cinética de inativação térmica

A inativação térmica do *Lactocaseibacillus casei* na bebida de laranja fermentada seguiu uma cinética de primeira ordem (Figura 2), indicando que a taxa de redução bacteriana é diretamente proporcional à população remanescente (BIGELOW, 1921). O modelo de Bigelow proporcionou um ajuste robusto aos dados experimentais ($R^2 \geq 0,984$) em todas as temperaturas.

Como esperado, o tempo de redução decimal (valor D) diminuiu

exponencialmente com o aumento da temperatura, caindo de 11,12 min a 50 °C para 1,44 min a 60 °C. O valor Z calculado, uma medida da sensibilidade do valor D à temperatura, foi de $11,28 \pm 0,29$ °C ($R^2 = 0,996$; $MSE = 0,0005$), evidenciando a forte dependência da taxa de inativação em relação à temperatura (Tabela 1).

Figura 2 - Cinética de primeira ordem ajustada à redução logarítmica de sobreviventes de *Lacticaseibacillus casei* após processamento térmico a 50, 55 e 60 ± 2 °C.



Nota: Os pontos de dados são expressos como média ± desvio padrão, derivados de dois experimentos independentes.

Fonte: Elaborada pelo autor (2026).

Tabela 1 – Parâmetros da cinética de primeira ordem para a inativação térmica de *Lactocaseibacillus casei* na bebida de laranja fermentado às temperaturas de 50 °C, 55 °C e 60 °C.*

T (°C)	PRIMEIRA ORDEM	
	Valor D ± DP (min)	Valor Z ± EP (°C)
50	11.12 ± 0.37	11.28 ± 0.29
55	4.09 ± 0.39	R ² = 0.996
60	1.44 ± 0.02	

Nota: Os valores D representam o tempo necessário para reduzir a população microbiana por um fator de 10, e os valores Z indicam o aumento de temperatura necessário para atingir uma redução de 10 vezes no valor D (Equações 2 e 3). O EP (Erro Padrão) indica a incerteza nos parâmetros estimados. O ajuste do modelo foi avaliado através do valor R² (variando de 0,984 a 0,997), demonstrando uma correlação robusta. Todos os valores são apresentados como média ± desvio padrão (DP), derivados de dois experimentos independentes.

Fonte: Elaborada pelo autor (2026).

Estes resultados alinham-se aos mecanismos estabelecidos de inativação térmica, os quais são impulsionados primariamente pela desestabilização sinérgica de estruturas celulares críticas. O calor induz a desnaturação de proteínas e enzimas essenciais, rompendo sua conformação tridimensional e paralisando a função metabólica (DASH *et al.*, 2022). Simultaneamente, o estresse térmico compromete a permeabilidade seletiva da bicamada lipídica, levando ao vazamento de componentes intracelulares vitais (LINDSAY *et al.*, 2021). Além disso, altas temperaturas podem desencadear a clivagem das ligações fosfodiéster nos ácidos nucleicos, resultando na fragmentação do DNA e do RNA, o que impede a replicação (HABIBI *et al.*, 2022). Em conjunto, esses mecanismos asseguram a inativação eficaz e irreversível dos microrganismos, constituindo uma etapa crítica para a segurança de alimentos e para a extensão da vida de prateleira.

Embora esses mecanismos sejam universalmente reconhecidos, as rápidas taxas cinéticas observadas neste estudo (por exemplo, D₆₀ °C = 1,44 min) devem ser analisadas criticamente dentro do contexto da matriz alimentar avaliada. O perfil altamente ácido da bebida de laranja fermentada atua como uma barreira (*hurdle*) sinérgica quando combinada ao tratamento térmico (LEISTNER, 2000). À medida que o calor moderado aumenta a fluidez e a permeabilidade da bicamada lipídica bacteriana (CEBRIÁN *et al.*,

2017), ele facilita simultaneamente o influxo maciço de prótons extracelulares e de ácido láctico não dissociado do meio em direção ao citoplasma. Essa rápida ruptura da homeostase do pH intracelular impõe uma exaustão metabólica avassaladora ao *Lactocaseibacillus casei*, acelerando drasticamente a desnaturação irreversível de suas enzimas vitais internas (LUND *et al.*, 2020). Esse efeito sinérgico impulsionado pela matriz explica a razão pela qual essas temperaturas brandas de pasteurização se mostraram altamente eficazes na obtenção de rápidas reduções decimais.

Os achados desta etapa corroboram a adoção de uma estratégia otimizada de inativação térmica, em contraste com protocolos anteriores que dependiam de regimes térmicos severos (80–100 °C por 5–30 min) para inativar cepas como *Lactobacillus reuteri* e *Lactocaseibacillus casei* (ALMADA *et al.*, 2021; KIM *et al.*, 2022). Tais condições agressivas de processamento podem comprometer o perfil sensorial e a integridade funcional do produto final. Em contrapartida, este estudo destaca a viabilidade da produção de pós-bióticos por meio de uma inativação precisa em temperaturas brandas. Foi demonstrado que uma redução de 14 ciclos logarítmicos pode ser efetivamente alcançada em 20,2 min a 60 °C. Embora as extrapolações para altas temperaturas prevejam tempos de processamento mais curtos (por exemplo, 17 s a 80 °C), o protocolo de temperatura branda proposto oferece uma rota superior, que equilibra a eficiência de tempo com uma robusta preservação físico-química. Essa viabilidade cinética fundamenta diretamente a alta retenção de compostos bioativos nesta matriz específica, previamente demonstrada por nosso grupo sob condições brandas similares (NASCIMENTO *et al.*, 2025).

4.3.2 Efeito da temperatura na cinética de inativação microbiana por TS (10 W/mL): Câmara confinada de aço inoxidável (Reator I, 10 mL)

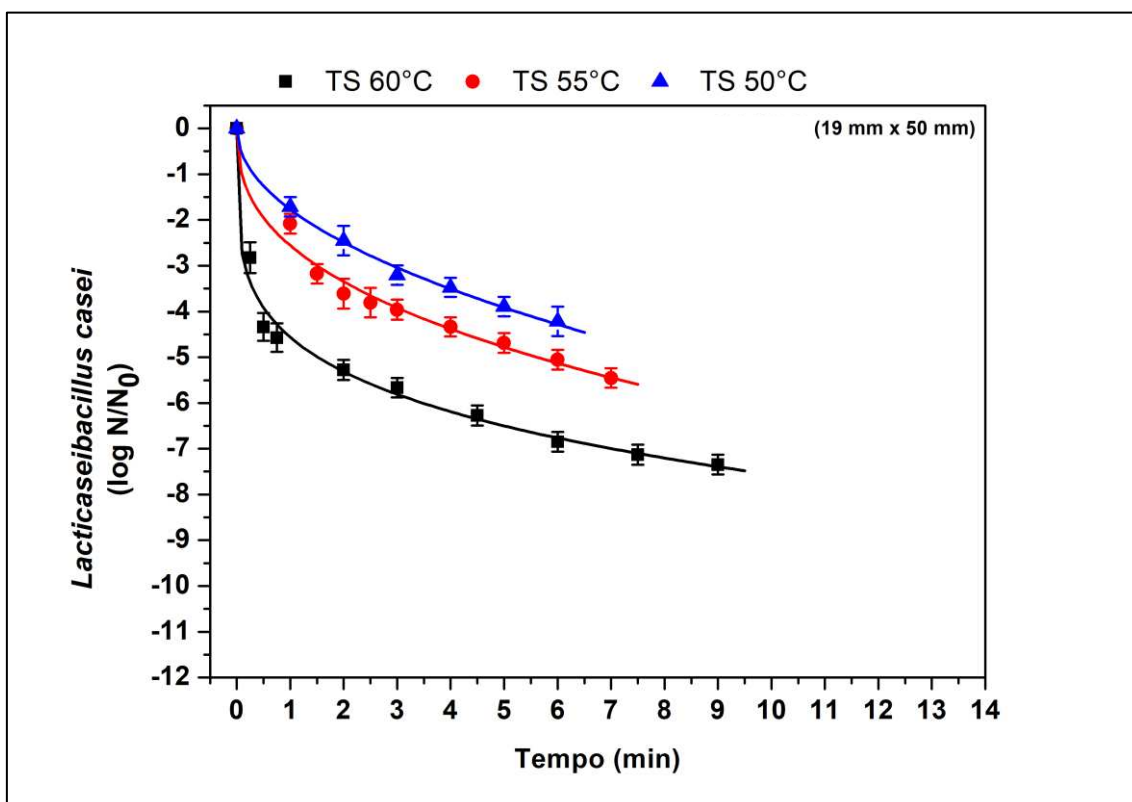
Para avaliar o efeito sinérgico do calor e da cavitação acústica, a cinética de inativação do *L. casei* foi avaliada sob termossonicação de alta intensidade (10 W/mL) em três diferentes temperaturas (50, 55 e 60 °C).

Embora a pasteurização térmica tenha se mostrado eficaz, a termossonicação também foi explorada como uma alternativa promissora para comparação direta, oferecendo uma via potencial para otimizações futuras. A cinética de inativação de *L. casei* utilizando termossonicação de alta intensidade (10 W/mL) foi inicialmente avaliada no Reator I (câmara confinada de aço inoxidável, 19 mm x 50 mm). Em contraste com a

linearidade de primeira ordem observada durante o processamento térmico convencional, o processo de termossonicação neste reator confinado seguiu um comportamento não linear do tipo Weibull (Figura 3).

O modelo de Weibull foi empregado para descrever esse perfil complexo de inativação, no qual a taxa de letalidade não é constante, mas varia ao longo do tempo (WEIBULL, 1951). O modelo mostrou-se altamente adequado para descrever a inativação do *L. casei*, apresentando elevados valores de R^2 ajustado (0,978–0,992) e baixos valores de Erro Quadrático Médio (0,011–0,091) (Tabela 2).

Figura 3 – Modelo de Weibull ajustado à redução logarítmica de sobreviventes de *Lactocaseibacillus casei* após termossonicação a 10 W/mL nas temperaturas de 50, 55 e 60 ± 2 °C.



Nota: O tratamento foi conduzido em câmara confinada de aço inoxidável (19 mm × 50 mm) contendo 8,5 mL de néctar fermentado, utilizando sonda de ultrassom de 7 mm. Os pontos de dados são apresentados como média ± desvio padrão (DP), obtidos de dois experimentos independentes.

Fonte: Elaborada pelo autor (2026).

Tabela 2 – Parâmetros do modelo de Weibull para a inativação por termossonicação (10 W/mL) de *Lacticaseibacillus casei* na bebida de laranja fermentado a temperaturas de 50, 55 e 60 ± 2 °C

T (°C)	WEIBULL	
	$b \pm SD$	$n \pm SD$
50	1.77 ± 0.05	0.49 ± 0.03
55	2.56 ± 0.10	0.39 ± 0.02
60	4.56 ± 0.06	0.22 ± 0.01

Nota: Os valores de b e n representam os fatores de escala e de forma do modelo de Weibull, respectivamente (Equação 4). O ajuste do modelo foi avaliado com base nos valores de MSE variando de 0,011 a 0,091 e valores de R^2 ajustado de 0,978 a 0,992, indicando uma forte correspondência entre o modelo e os dados. Os valores dos parâmetros são expressos como média ± desvio padrão (DP), derivados de dois experimentos independentes.

Fonte: Elaborada pelo autor (2026).

O modelo de Weibull é definido por dois parâmetros principais: o parâmetro de escala (b) e o parâmetro de forma (n). O parâmetro de escala (b) atua como um índice de taxa cinética; uma magnitude maior indica uma redução microbiana acelerada (WEIBULL, 1951). Analisando o efeito da temperatura, b exibiu uma forte correlação positiva com a temperatura, aumentando significativamente de 1,77 a 50 °C para 4,56 a 60 °C (Tabela 2). Esse aumento de 2,5 vezes na taxa de inativação quantifica a letalidade aprimorada em condições térmicas elevadas, demonstrando o forte efeito sinérgico entre a cavitação acústica e o calor na aceleração do dano celular.

Por outro lado, o parâmetro de forma (n) dita a curvatura do gráfico de sobrevivência. Valores de $n < 1$ caracterizam uma curva com concavidade voltada para cima, indicativa de uma fase inicial de inativação rápida seguida por uma desaceleração – um fenômeno denominado efeito de cauda (*tailing*). Os dados experimentais obtidos neste estudo resultaram consistentemente em $n < 1$ em todas as temperaturas testadas (Tabela 2). Isso confirma a persistência de subpopulações, um comportamento cinético o qual levanta-se a hipótese de estar intrinsecamente ligado à configuração global específica do Reator I, incluindo as propriedades acústicas de seu material, o

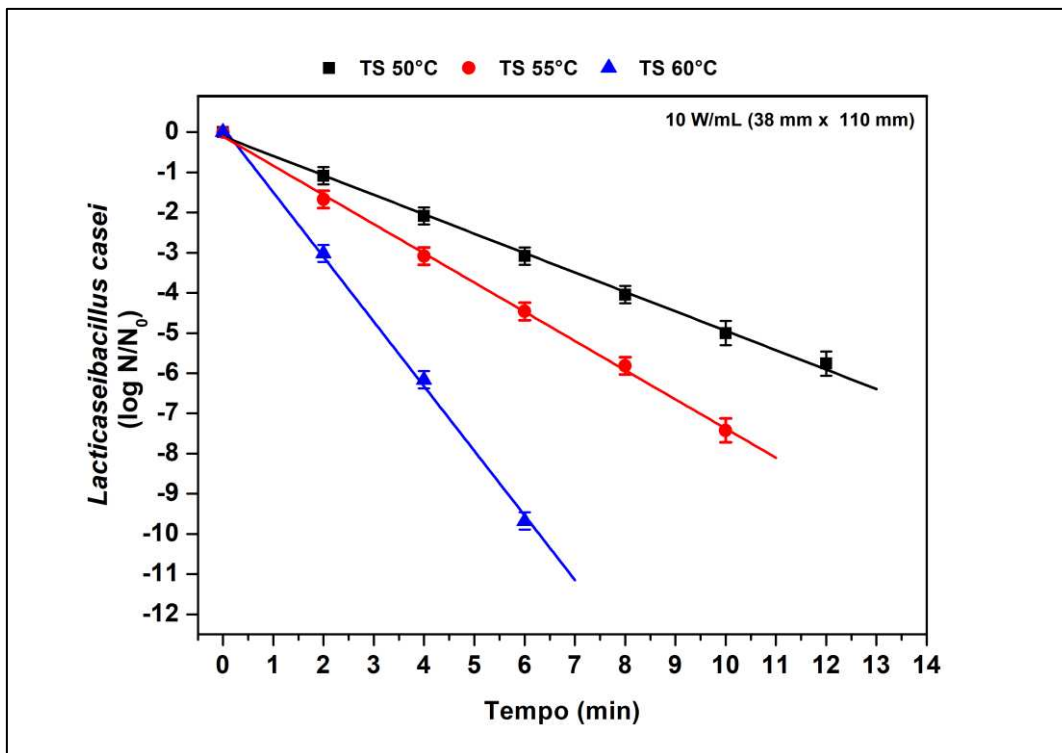
confinamento espacial e a frequência de operação. Tais achados alinham-se à literatura prévia, que sugere que o modelo de Weibull pode ser adequado para descrever a cinética não linear inerente aos complexos processos de termossonicação (PANARO *et al.*, 2024; SASIKUMAR *et al.*, 2019; SORO *et al.*, 2021).

4.3.3 Efeito da temperatura na cinética de inativação microbiana por TS (10 W/mL): Reator de vidro (Reator II, 100 mL)

Para determinar se o efeito de cauda (*tailing*) observado era uma limitação inerente da termossonicação ou uma consequência do tipo de reator confinado, o processo foi subsequentemente avaliado em um reator de vidro maior, equipado com um sonotrodo diferente. A cinética de inativação de *L. casei* foi avaliada no Reator II (reator de vidro padrão, 38 mm × 110 mm) em uma densidade de potência comparável (10 W/mL).

Em contraste com o comportamento não linear observado na câmara de aço confinada (Reator I), a inativação no Reator II seguiu uma rigorosa cinética de primeira ordem, descrita com precisão pelo modelo de Bigelow (Figura 4). O modelo proporcionou um ajuste robusto aos dados experimentais, com elevados valores de R^2 ($\geq 0,99$) em todas as temperaturas testadas.

Figura 4 – Cinética de primeira ordem ajustada à redução logarítmica de sobreviventes de *Lactocaseibacillus casei* após processamento por termossonicação a 10 W/mL em 50, 55 e 60 ± 2 °C.



Nota: O tratamento foi realizado em reator de vidro (38 mm × 110 mm) contendo 50 mL de néctar fermentado, utilizando sonda de ultrassom de 13 mm. Os pontos de dados são expressos como média ± desvio padrão, derivados de dois experimentos independentes.

Fonte: Elaborada pelo autor (2026).

Tabela 3 – Parâmetros cinéticos de primeira ordem para a inativação por termossonicação (10 W/mL) de *Lactocaseibacillus casei* na bebida de laranja fermentado a temperaturas de 50 °C, 55 °C e 60 °C.

T (°C)	PIMEIRA ORDEM	
	Valor D ± DP (min)	Valor Z ± EP (°C)
50	2.07 ± 0.27	19.10 ± 3.61
55	1.38 ± 0.19	R ² = 0.965
60	0.62 ± 0.06	

Nota: Os valores D representam o tempo necessário para reduzir a população microbiana por um fator de 10 (um ciclo logarítmico), e os valores Z indicam o aumento de temperatura necessário para atingir uma redução de 10 vezes no valor D (Equações 2 e 3). O EP (Erro Padrão) indica a incerteza nos parâmetros

estimados. O ajuste do modelo foi avaliado por meio do valor de R^2 ($\geq 0,99$), demonstrando uma correlação robusta. Todos os valores são apresentados como média $\pm$ desvio padrão (DP), derivados de dois experimentos independentes.

Fonte: Elaborada pelo autor (2026).

Os valores D para a termossonicação no reator de vidro foram significativamente menores do que aqueles do processamento térmico, com valores de 2,07 min a 50 °C, 1,38 min a 55 °C e 0,62 min a 60 °C (Tabela 3). O valor Z foi de $19,10 \pm 3,61$ °C ($R^2 = 0,965$; MSE = 0,0016). Esse aumento observado no valor Z (redução da sensibilidade térmica) em comparação ao processo térmico confirma que, na termossonicação, o mecanismo de inativação é dominado pela cavitação acústica física, em vez de por efeitos puramente térmicos (FENG *et al.*, 2022; HASHEMI *et al.*, 2024).

Mecanicamente, esse fenômeno é impulsionado por dois fatores termodinâmicos acústicos simultâneos. Primeiro, a teoria do "ponto quente" (*hot spot*) sustenta que as condições locais extremas geradas durante o colapso violento das bolhas de cavitação atuam como o estressor letal primário, tornando secundária a temperatura global do fluido. Segundo, à medida que a temperatura global da matriz aumenta, sua pressão de vapor se eleva, fazendo com que o vapor se difunda para o interior das bolhas de cavitação. Durante a implosão, esse vapor exerce um "efeito de amortecimento" (*cushioning effect*) que atenua a violência do colapso e reduz o cisalhamento mecânico gerado (PIYASENA *et al.*, 2003; BHARGAVA *et al.*, 2021). Essa interação antagônica – na qual temperaturas elevadas aceleram a letalidade térmica enquanto amortecem simultaneamente a intensidade da cavitação – explica a razão pela qual os processos de termossonicação exibem um valor Z maior e uma sensibilidade reduzida às variações da temperatura global. Esse comportamento físico robusto alinha-se diretamente aos achados de Hashemi *et al.* (2024), que observaram que um aumento de 20 °C na temperatura de termossonicação resultou em apenas uma redução marginal nos valores Z de *Escherichia coli* e *Salmonella Typhi* em suco de aipo.

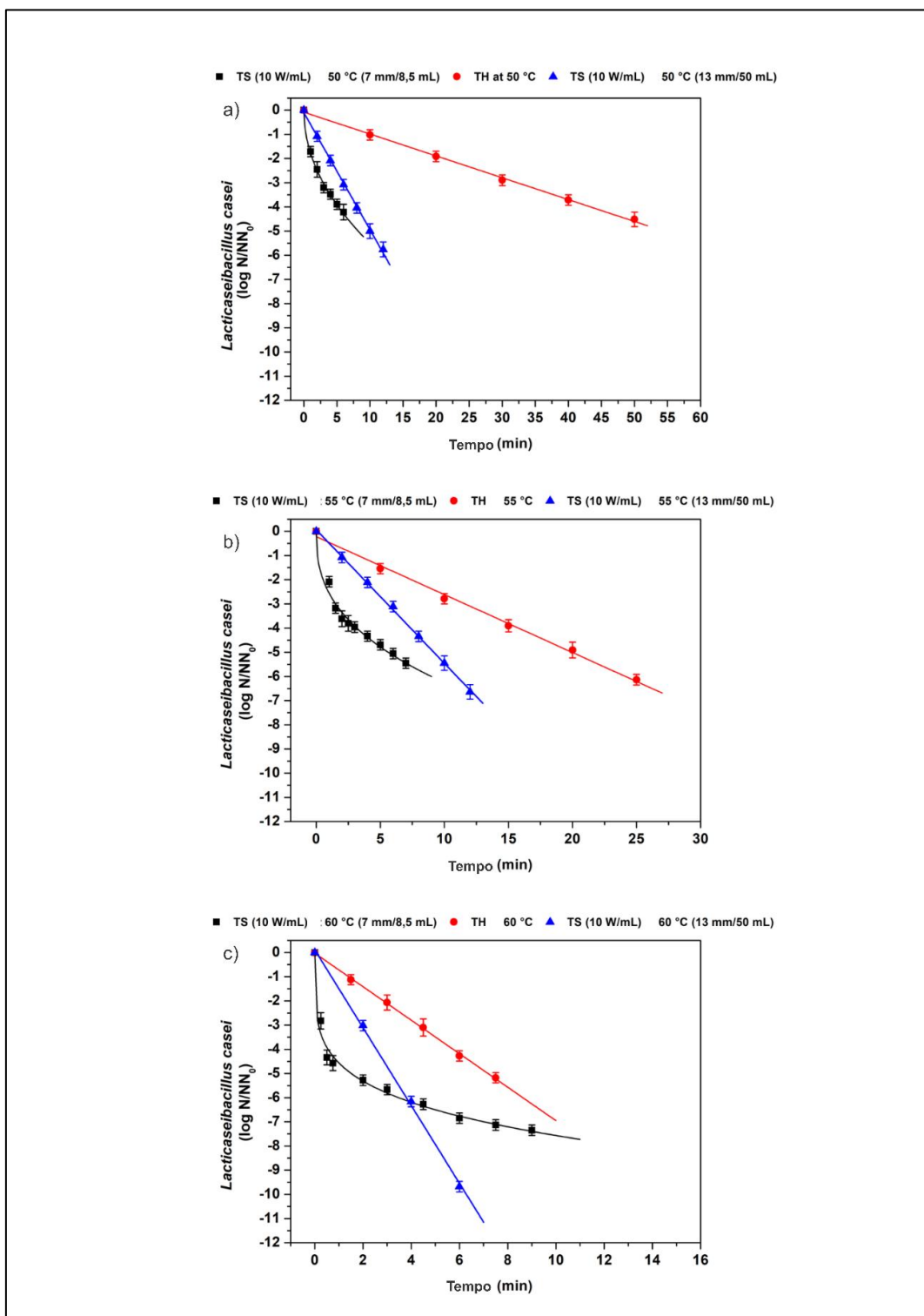
O acoplamento sinérgico do calor e do ultrassom acelera a letalidade microbiana. De acordo com a literatura acústica e microbiológica estabelecida, essa sinergia é impulsionada pela atuação simultânea em múltiplos alvos celulares (NAGY *et al.*, 2024; SOTELO-LARA *et al.*, 2024; SULAIMAN; SILVA, 2026). O modo de ação primário é amplamente atribuído à cavitação acústica — a formação e o colapso violento de microbolhas induzidos pelo ultrassom de alta intensidade. Fisicamente, sabe-se que esse

colapso gera microjatos de alta velocidade e intensas forças de cisalhamento que podem romper mecanicamente as paredes e membranas celulares (NUNES *et al.*, 2022). Quimicamente, tem sido amplamente relatado que o ambiente sonolítico promove a formação de radicais livres altamente reativos no DNA, proteínas e lipídios intracelulares (RATHNAYAKE *et al.*, 2025; QIN *et al.*, 2024). Termodinamicamente, a energia dissipada durante o colapso das bolhas cria pontos quentes (*hotspots*) localizados. Quando combinado ao tratamento térmico global, levanta-se a hipótese de que esse efeito sensibilize sinergicamente a população microbiana, permitindo uma rápida inativação em temperaturas mais baixas e tempos de exposição mais curtos do que na pasteurização convencional (ABDULSTAR *et al.*, 2023).

4.3.4 Comparação entre termossonicação a 10 W/mL e inativação térmica de *Lactocaseibacillus casei* a diferentes temperaturas (reatores I e II)

Conforme ilustrado na Figura 5, ambos os reatores ultrassônicos (Reatores I e II) superaram significativamente o controle térmico, demonstrando o substancial efeito sinérgico entre o calor e a cavitação acústica. O processo de TS no reator de vidro (Reator II) alcançou um valor $D_{60}^{\circ C}$ de 0,62 min, reduzindo os tempos de processamento em aproximadamente 57% em comparação ao processamento térmico convencional ($D_{60} = 1,44$ min). Isso corrobora achados anteriores que demonstram a eficácia da TS em reduzir drasticamente os tempos de pasteurização (EVELYN; SILVA, 2016; PANARO *et al.*, 2024).

Figura 5 – Comparação entre termossonicação (reatores I e II) e inativação térmica de *Lactocaseibacillus casei* em néctar de laranja fermentado a (a) 50 °C, (b) 55 °C e (c) 60 °C.



Nota: Os pontos de dados são apresentados como média $\pm$ desvio padrão (DP), obtidos de dois experimentos independentes.

Fonte: Elaborada pelo autor (2026).

No entanto, uma análise crítica dos padrões cinéticos (Figura 5) sugere que o tipo de reator – englobando as propriedades acústicas do material, o confinamento espacial e a frequência de operação – influenciou fortemente o comportamento de inativação. É importante reconhecer que a transição entre essas configurações ultrassônicas comerciais envolveu mudanças simultâneas no diâmetro da sonda, na frequência (de 26 para 18 kHz) e no volume da amostra. Portanto, as mudanças cinéticas observadas refletem o impacto macroscópico combinado de todo o sistema.

O Reator I (câmara de aço) exibiu uma rápida redução inicial de 5 ciclos logarítmicos, mas subsequentemente desenvolveu um efeito de cauda (*tailing*) do tipo Weibull ($n < 1$). A interação entre as ondas acústicas e as fronteiras do reator – levando a fenômenos como ondas estacionárias ou escoamento acústico (*acoustic streaming*) – desempenha um papel decisivo na uniformidade do tratamento e na previsibilidade do processo (CHAKRABORTY *et al.*, 2025; KEWALRAMANI *et al.*, 2023). Especificamente, a incompatibilidade de impedância acústica na interface entre o material do reator e o meio líquido determina o grau de reflexão da energia acústica e a distribuição espacial das zonas de cavitação (GOGATE *et al.*, 2001).

No Reator I, levanta-se a hipótese de que essa divergência não linear resulte da interação entre fatores macroscópicos e microscópicos. Macroscopicamente, a distância entre o sonotrodo e as paredes – aliada à profundidade de imersão central, que posiciona a ponta emissora em estreita proximidade tridimensional com todos os limites de aço circundantes – restringe a circulação global do fluido. Esse arranjo espacial confinado é teoricamente exacerbado pela alta impedância acústica do aço inoxidável (≈ 46 MRayls) em comparação com a bebida ($\approx 1,6$ MRayls). Embora o mapeamento acústico empírico direto não tenha sido realizado neste estudo, postula-se que essa imensa incompatibilidade de impedância cause uma severa reflexão das ondas acústicas nas fronteiras sólido-líquido. De acordo com os princípios acústicos estabelecidos, essa reflexão impulsiona a formação de complexos campos de ondas estacionárias e zonas mortas acústicas macroscópicas. Esse arcabouço físico teórico fornece uma explicação robusta para os dados biológicos de sobrevivência observados, embora exija validação futura por meio de medições acústicas precisas (GOGATE *et al.*, 2001; KEWALRAMANI *et al.*, 2023; MASON; LORIMER, 2003).

Além disso, a rugosidade superficial microscópica (R_a tipicamente de 0,4 a 0,8 μm) do material do reator pode reter fisicamente bolhas de cavitação e alterar os campos acústicos locais, levando a perfis de sobrevivência inesperados (BRENNEN, 1995; VYAS

et al., 2020; ALTAY *et al.*, 2020). Consequentemente, é plausível que as subpopulações sobreviventes se beneficiem da energia de cavitação amortecida nessas "zonas mortas" localizadas e nas camadas limite. Está bem estabelecido na microbiologia preditiva que as subpopulações resistentes e os fenômenos de cauda podem surgir de múltiplas causas inerentes, totalmente independentes da acústica, como a heterogeneidade fenotípica, a robustez das células na fase estacionária de crescimento ou o efeito de blindagem protetora da complexa matriz alimentar (por exemplo, sólidos solúveis e polpa em suspensão) (BHARGAVA *et al.*, 2021; ASPRIDOU; KOUTSOUMANIS, 2015).

No entanto, como o exato mesmo inóculo padronizado e a mesma matriz fermentada foram utilizados em todos os tratamentos deste estudo, esses fatores biológicos e físico-químicos não podem, de forma independente, explicar as mudanças cinéticas. Pelo contrário, é altamente provável que a configuração confinada específica do reator de aço exacerbe fisicamente essas barreiras inerentes, empurrando as células protegidas pela matriz para zonas mortas sem circulação, onde a letalidade acústica é criticamente atenuada, manifestando-se, em última análise, como o efeito de cauda observado.

Em contrapartida, a cinética de inativação no Reator II (vidro) indicou um processo de taxa constante e altamente previsível. Embora uma cinética estritamente linear não confirme necessariamente um campo de cavitação acústica microscopicamente homogêneo, ela indica que a configuração específica do reator proporcionou uma eficiente mistura macroscópica do fluido. Levanta-se a hipótese de que as paredes de vidro teoricamente lisas (R_a nominal da literatura $< 0,05 \mu\text{m}$) e a menor impedância acústica do material ($\approx 13 \text{ MRayls}$) minimizem a atenuação acústica de fronteira como um fator complementar. Além disso, a profundidade de imersão rasa (15 mm abaixo da superfície) proporcionou estrategicamente um volume maior e desimpedido de fluido global abaixo da sonda. Postula-se que essa configuração espacial global facilite um vigoroso escoamento acústico macroscópico, promovendo uma circulação altamente uniforme da matriz fluida pelas zonas localizadas de alta cavitação, resultando na letalidade média temporal constante observada (GOGATE; PANDIT, 2004).

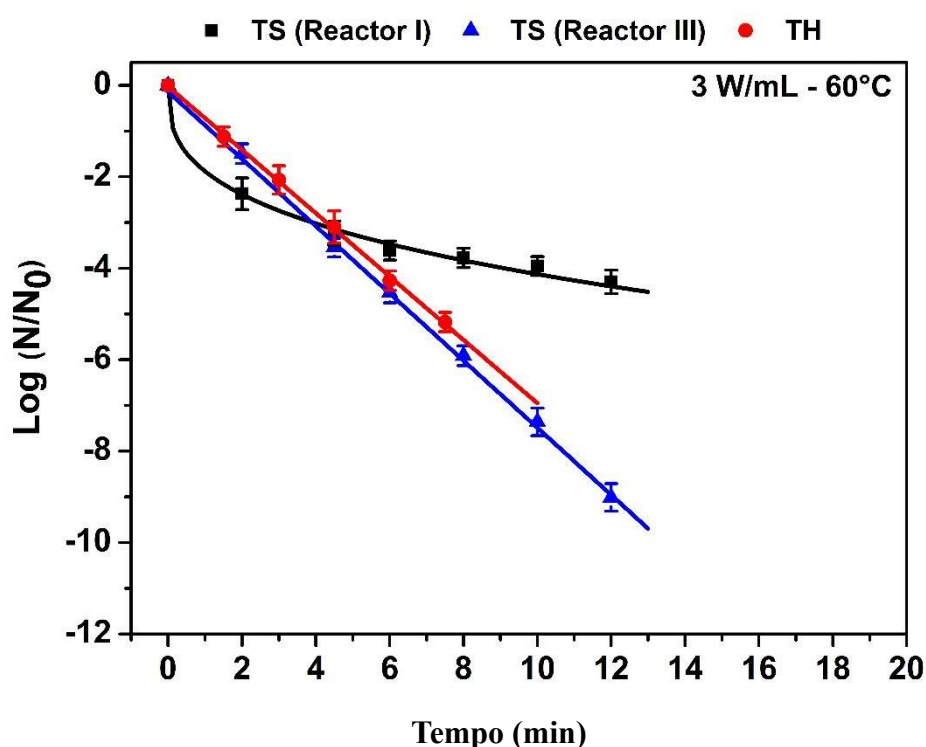
Ademais, esta abordagem de termossonicação apresenta eficiência superior em comparação com a literatura anterior, que frequentemente exigia processamento prolongado a temperaturas mais baixas (ex.: $> 40 \text{ min}$ para uma redução de 5 ciclos logarítmicos; ALMADA *et al.*, 2021) ou regimes térmicos severos (ex.: 80°C por 30 min; ABEDI *et al.*, 2022). Ao alcançar uma rápida e extensa redução microbiana a uma

temperatura branda de 60 °C, este processo homogêneo equilibra a inativação microbiana previsível (devido à linearidade) com o mínimo de degradação térmica.

4.3.5 Comparação da termossonicação a 3 W/mL (Reatores I e III) e inativação térmica

Para determinar se a divergência cinética observada sob alta intensidade mantinha-se consistente em condições mais brandas, a densidade de potência acústica foi reduzida para 3 W/mL. O Reator I foi avaliado a fim de constatar se um menor aporte de energia seria capaz de minimizar as severas reflexões de onda. Paralelamente, um recipiente de vidro maior, com capacidade para 250 mL (Reator III, 69,5 mm × 89 mm), contendo 150 mL de bebida, foi empregado para verificar se a redução do aporte energético e o aumento da distância espacial entre o sonotrodo e as paredes alterariam a homogeneidade cinética. Os parâmetros cinéticos estão resumidos na Tabela 4, e as respectivas curvas de sobrevivência encontram-se ilustradas na Figura 6.

Figure 6 - Cinética de inativação de *Lactocaseibacillus casei* na bebida de laranja fermentada durante o processamento térmico (TH) e a termossonicação (TS) a 3 W/mL a 60 °C.



Nota: Os tratamentos de TS foram realizados em uma câmara de aço confinada (Reator I) e em um reator de vidro (Reator III). Os pontos de dados são apresentados como média $\pm$ desvio padrão (DP), obtidos de dois experimentos independentes.

Fonte: Elaborada pelo autor (2026).

Tabela 4 – Efeito do tipo de reator nos parâmetros cinéticos de inativação de *Lactocaseibacillus casei* na bebida de laranja fermentada a 60 °C.

Tipo de reator	Densidade de potência (W/mL)	Modelo cinético	Valor-D $\pm$ DP (min)	Weibull $b \pm$ DP (min ⁻ⁿ)	Weibull $n \pm$ DP	R ²	MSE
Reator I	3	Weibull	—	1.88 $\pm$ 0.02	0.34 $\pm$ 0.018	0.98	0.037
Reator III	3	Bigelow	1.36 $\pm$ 0.13	—	—	0.99	< 0.01

Nota: Os valores são expressos como média $\pm$ desvio padrão (DP), derivados de dois experimentos independentes. Valor D: Tempo de redução decimal (min) calculado pelo modelo de Bigelow; b : Fator de escala (tempo⁻ⁿ) do modelo de Weibull; n : Fator de forma (adimensional) do modelo de Weibull, em que $n < 1$ indica um efeito de cauda (*tailing*); MSE: Erro Quadrático Médio; R²: Coeficiente de determinação.

Fonte: Elaborada pelo autor (2026).

Apesar da redução drástica na potência acústica, os perfis cinéticos dos dois reatores permaneceram fundamentalmente distintos, espelhando perfeitamente o comportamento observado em alta intensidade (10 W/mL). O Reator I continuou a exibir um perfil de inativação não linear de Weibull, caracterizado por uma rápida redução inicial seguida por um pronunciado e indesejável efeito de cauda (*tailing*) ($n = 0,34$). Essa persistência indica que simplesmente reduzir o aporte de energia para minimizar as reflexões de fronteira foi ineficaz. Em vez disso, fornece suporte empírico à hipótese de que a configuração holística do tipo de reator atua como o fator determinante primário. O confinamento espacial específico e a geometria do sonotrodo dessa configuração — atuando sinergicamente com a topografia inerentemente mais rugosa da câmara de aço — constituem fatores combinados plausíveis para a obtenção de uma cinética de inativação não linear, ocorrendo de forma independente da energia acústica total aplicada (ALTAY *et al.*, 2020; VYAS *et al.*, 2020). Ademais, isso reforça a presença teorizada de subpopulações fisicamente protegidas em hipotéticas "zonas mortas" associadas a

campos de ondas estacionárias dentro do reator confinado (GOGATE *et al.*, 2001; KEWALRAMANI *et al.*, 2023).

Em contrapartida, o Reator III manteve uma robusta cinética linear de primeira ordem ($D_{60}^{\circ\text{C}} = 1,36 \text{ min}$, $R^2 > 0,99$). Mesmo processando um volume de amostra substancialmente maior (150 mL) e operando a uma densidade de potência inferior, a superfície excepcionalmente lisa do material de vidro e sua baixa impedância acústica facilitaram a homogeneidade do processo, otimizando a distribuição da energia acústica por todo o maior volume de líquido (LIM *et al.*, 2014).

No entanto, sob uma perspectiva de engenharia, a semelhança entre o valor D do Reator III a 3 W/mL (1,36 min) e o do processamento térmico (1,44 min) destaca uma limitação industrial crítica. Nessa baixa densidade de potência, as forças de cisalhamento mecânico geradas pela cavitação acústica podem ser insuficientes para romper sinergicamente a robusta parede celular de peptidoglicano do microrganismo Gram-positivo *L. casei*. Consequentemente, neste caso, a inativação microbiana pode ser impulsionada primariamente pelo efeito térmico global. Isso indica que a operação de sonoreatores em baixas densidades de potência é provavelmente inadequada dos pontos de vista energético e econômico para essa matriz, uma vez que os trocadores de calor industriais convencionais podem alcançar uma letalidade equivalente com uma eficiência energética substancialmente maior e menores custos de capital.

Esses achados indicam que manter uma densidade de potência acústica constante é insuficiente para garantir a previsibilidade do processo caso a configuração global do reator não seja otimizada. Por fim, isso destaca a configuração do reator de vidro maior como uma via altamente previsível e robusta para a inativação microbiana.

4.3.6 Condições recomendadas para a produção de bebida pós-biótica com base na cinética em escala de laboratório

Para assegurar a segurança e a estabilidade de uma bebida pós-biótica, exige-se um protocolo de inativação robusto. Dado que as populações de *L. casei* neste estudo atingiram até 12 log UFC/mL ao final da fermentação, recomenda-se uma meta conservadora de redução de 14 ciclos logarítmicos para garantir a ausência de células viáveis. Com base nos parâmetros cinéticos obtidos a 60 °C, delineiam-se três cenários teóricos de processamento distintos como linhas de base fundamentais:

- **(I) Processamento térmico (Controle de Referência):** O processamento em batelada isotérmico serve como o referencial cinético fundamental para avaliar a inativação puramente térmica. Uma vez que a inativação térmica seguiu uma cinética linear (modelo de Bigelow) com um valor $D_{60\text{ °C}} = 1,44\text{ min}$, o tempo teórico de processamento necessário para uma redução de 14 ciclos logarítmicos é calculado como: $14\text{ ciclos} \times 1,44\text{ min} = 20,2\text{ minutos}$.
- **(II) Processamento híbrido TS-térmico:** Para instalações que operam com câmaras de aço confinadas, nas quais a alta impedância acústica e a topografia da superfície podem induzir "zonas mortas" e efeitos de cauda (semelhante ao Reator I), uma abordagem combinada poderia ser utilizada para mitigar a sobrevivência de subpopulações. Essa estratégia aproveita a rápida letalidade inicial do ultrassom seguida por um período de retenção térmica. **Fase 1 (Choque de TS):** 2 minutos de TS a 10 W/mL a 60 °C (atinge uma rápida redução de 5 ciclos logarítmicos, conforme observado no Reator I). **Fase 2 (Acabamento térmico):** Retenção térmica para eliminar a subpopulação remanescente (exigindo uma redução adicional de 9 ciclos logarítmicos). Utilizando o valor $D_{60\text{ °C}} = 1,44\text{ min}$: $9\text{ ciclos} \times 1,44\text{ min} \approx 13\text{ minutos}$. **Tempo teórico total de processamento:** 15 minutos.
- **(III) Termossonicação homogênea:** Com base na robusta cinética linear observada no reator de vidro (Reator II), configurações com menor impedância acústica e topografia nominal mais lisa parecem assegurar um escoamento acústico (*acoustic streaming*) adequado e uma distribuição de energia mais uniforme, indicando esta configuração como uma linha de base altamente promissora para futuros estudos de aumento de escala (*scale-up*). **Condições:** 60 °C, 10 W/mL, utilizando tipos de reatores com baixa impedância acústica e topografia lisa para minimizar a reflexão de ondas e a atenuação de fronteira. **Parâmetro:** $D_{60\text{ °C}} = 0,62\text{ min}$. **Tempo teórico total de processamento:** $14\text{ ciclos} \times 0,62\text{ min} \approx 8,7\text{ minutos}$.

Embora os modelos cinéticos empíricos demonstrem claramente o impacto macroscópico do tipo de reator nos padrões de inativação microbiana, os fenômenos acústicos subjacentes aqui discutidos (como a formação de ondas estacionárias, a atenuação de fronteira e o escoamento acústico espacial) permanecem como inferências teóricas extraídas da literatura estabelecida de engenharia acústica. Pesquisas futuras devem priorizar a validação física direta desses mecanismos utilizando técnicas

avançadas, como a Dinâmica dos Fluidos Computacional (CFD), a imagem por sonoluminescência ou o mapeamento direto de pressão por hidrofone.

Ademais, é fundamental enfatizar que esses cenários representam linhas de base de prova de conceito em escala de laboratório. Qualquer transição para a implementação industrial exige subsequente validação em escala piloto e avaliações tecnoeconômicas abrangentes – particularmente análises do consumo específico de energia – para garantir que o processo seja fisicamente escalável e economicamente viável.

4.4 Conclusão

Este estudo demonstrou que a termossonicação (TS) a 60 °C é uma tecnologia de alta eficiência temporal para a produção de uma bebida pós-biótica de *Lactocaseibacillus casei* em escala de laboratório, reduzindo o valor-D em 57% em comparação a um processo exclusivamente térmico. Observou-se que a cinética de inativação dos microrganismos variou drasticamente dependendo das dimensões espaciais do reator, das propriedades acústicas do material e da topografia da superfície, mesmo quando parâmetros operacionais, como densidade de potência e temperatura, foram mantidos constantes.

Um achado crítico desta pesquisa foi a forte associação entre o ambiente do reator e a previsibilidade do processo. A câmara confinada de aço inoxidável foi associada a uma inativação não linear de Weibull, caracterizada por um efeito de cauda (*tailing*) resistente. Levanta-se a hipótese de que esse comportamento cinético complexo seja impulsionado não apenas por propriedades isoladas do material, mas pela configuração holística do tipo de reator. Postula-se que o rigoroso confinamento espacial e a imensa incompatibilidade de impedância acústica – atuando sinergicamente com a topografia inerentemente mais rugosa do aço – impulsionem em conjunto severas reflexões de ondas de fronteira e a formação de zonas mortas macroscópicas, protegendo fisicamente as células do cisalhamento acústico letal. Em contrapartida, a transição para reatores de vidro correlacionou-se a uma inativação estritamente linear e altamente previsível ($R^2 > 0,99$). Propõe-se que a menor impedância acústica do material de vidro e a topografia teoricamente mais lisa tenham facilitado um vigoroso escoamento acústico (*acoustic streaming*) macroscópico, resultando em uma exposição de energia média temporal mais uniforme, o que mitigou efetivamente a sobrevivência de subpopulações resistentes.

Fundamentalmente, esses resultados sugerem que a otimização do tipo de reator – incluindo dimensões espaciais e propriedades acústicas do material – é tão vital quanto a otimização da potência e da temperatura. Embora este estudo destaque o imenso potencial da termossonicação homogênea como uma tecnologia robusta e previsível para a produção de pós-bióticos, futuras validações em escala piloto e rigorosas avaliações tecnoeconômicas e energéticas permanecem essenciais para averiguar plenamente sua viabilidade para o aumento de escala (*scale-up*) industrial.

5 SUCOS DE ACEROLA POTENCIALMENTE PÓS-BIÓTICOS OBTIDOS POR PROCESSAMENTO TÉRMICO E TERMOSSONICAÇÃO: EFEITOS NA ASSINATURA ECOLÓGICA *IN VITRO* DA MICROBIOTA INTESTINAL HUMANA

RESUMO

A eficácia dos pós-bióticos é intrinsecamente governada pela forma como as tecnologias de inativação reestruturam a matriz alimentar e influenciam a subsequente fermentação intestinal. Este estudo comparou os efeitos do tratamento térmico (80 °C, 10 min; TH-80) *versus* a termossonicação (60 °C, 10 min, 3300 W·L⁻¹; TS-60) nos produtos finais da fermentação do suco de acerola fermentado por *Lactocaseibacillus casei* utilizando um modelo INFOGEST 2.0 de digestão *in vitro* e fermentação colônica humana. Embora ambos os métodos tenham garantido a inativação microbiana completa, eles impulsionaram assinaturas ecológicas divergentes. O tratamento TH-80 resultou em um pós-biótico butirogênico que suprimiu *Proteobacteria* disbióticas (45,9%) e enriqueceu comensais benéficos com potencial emergente de probióticos de próxima geração, especificamente os gêneros *Phascolarctobacterium* e *Bacteroides*. Essa coocorrência taxonômica, aliada aos altos rendimentos de propionato (2,27 ± 0,15 g/L) e butirato (4,72 ± 0,38 g/L), consiste em uma forte evidência ecológica de uma simbiose impulsionada pelo succinato, provavelmente sustentada por açúcares da parede celular termicamente modificados e proteínas desnaturadas. Por outro lado, o suco termossonicado (TS-60) levou a uma expansão específica do gênero pró-inflamatório e proteolítico *Fusobacterium* (12,2%). Essa mudança ecológica sugere que a cavitação acústica pode alterar a bioacessibilidade de compostos nitrogenados de baixo peso molecular (peptídeos), criando um nicho para patobiontes oportunistas. Estes resultados demonstram que o tratamento térmico não é meramente uma etapa de preservação, mas uma estratégia direcionada de engenharia de matriz que reduz a disbiose ao promover um perfil de microbioma favorável por meio da modulação de nitrogênio e da formação de complexos resistentes de proteína-polifenol, enquanto simultaneamente alimenta redes benéficas de alimentação cruzada (*cross-feeding*).

Palavras-chave: Modulação da microbiota intestinal; *Cross-feeding*; Probióticos de próxima geração; Engenharia de matriz; Termossonicação; Ácidos graxos de cadeia curta.

5.1 Introdução

O impacto significativo da microbiota intestinal na saúde humana tem levado a extensas pesquisas sobre estratégias eficazes de modulação (AFZAAL *et al.*, 2022; MA *et al.*, 2023). Os probióticos têm sido tradicionalmente a intervenção primária; no entanto, sua eficácia está intrinsecamente ligada à viabilidade celular, que é frequentemente comprometida pelas condições de processamento industrial e pela passagem através do trato gastrointestinal. Consequentemente, a pesquisa contemporânea está explorando cada vez mais alternativas mais estáveis (BOYTE *et al.*, 2025; GARG *et al.*, 2026).

Os pós-bióticos — células microbianas deliberadamente inanimadas e/ou seus componentes que conferem benefício à saúde do hospedeiro — representam uma alternativa tecnológica robusta, superando as limitações intrínsecas de estabilidade dos probióticos viáveis (AKHAVAN *et al.*, 2026; SALMINEN *et al.*, 2021). Essas preparações constituem uma matriz complexa de estruturas celulares e metabólitos (por exemplo, ácidos graxos de cadeia curta — AGCCs) com efeitos promotores da saúde amplamente documentados (PRAJAPATI *et al.*, 2023; YEŞILYURT *et al.*, 2021). Sob a ótica da segurança clínica e alimentar, a inativação celular mitiga criticamente os riscos associados à translocação microbiana oportunista e à transferência horizontal de genes de resistência a antimicrobianos (BEEGUM; CHANDRAN, 2024; HOMAYOUNI RAD *et al.*, 2020).

O potencial terapêutico de um pós-biótico é ditado pela interação entre o substrato de fermentação e a tecnologia de inativação utilizada (PIMENTEL *et al.*, 2023; TIAN *et al.*, 2026). A inativação atua como uma importante operação unitária que elimina a viabilidade microbiana ao mesmo tempo em que altera o perfil físico-químico da matriz alimentar (AGGARWAL *et al.*, 2022). Embora o tratamento térmico (HT) convencional garanta a inativação microbiana, a termossonicação (TS) oferece uma alternativa, utilizando ultrassom e calor brando para preservar compostos bioativos frequentemente degradados por altas temperaturas (NASCIMENTO *et al.*, 2025).

Estudos recentes que avaliam os efeitos biológicos das tecnologias de inativação corroboram esse potencial funcional. Por exemplo, Neng *et al.* (2026) demonstraram que a cavitação acústica impulsionada pelo ultrassom rompeu efetivamente o envelope celular das bactérias lácticas, facilitando a liberação de metabólitos funcionais intracelulares que aumentaram significativamente as propriedades anti-inflamatórias do pós-biótico resultante. Além disso, Tian *et al.* (2026) estabeleceram que os distintos mecanismos

físicos e químicos de diferentes tecnologias de inativação reconfiguraram diretamente a arquitetura bioquímica da preparação final, ditando, em última análise, a sua bioatividade. Esses achados corroboram a hipótese de que os métodos de inativação não apenas asseguram a letalidade microbiana, mas atuam como importantes ferramentas de engenharia de matriz que ditam a modulação intestinal mediada por pós-bióticos (YOLMEH *et al.*, 2026).

Pesquisas recentes têm destacado o potencial do suco de acerola como substrato prebiótico (NASCIMENTO *et al.*, 2025; NASCIMENTO *et al.*, 2022); no entanto, o impacto da tecnologia de inativação na microbiota intestinal permanece inexplorado. Diferentes métodos de inativação não apenas eliminam a viabilidade celular; eles atuam como ferramentas distintas de engenharia de matriz. O processamento térmico tipicamente induz a desnaturação e agregação de proteínas, bem como a formação de complexos proteína-fenólico, o que pode prejudicar a bioacessibilidade do nitrogênio (PIQUÉ *et al.*, 2019). Em contraste, tecnologias de processamento híbrido emergentes, como a termossonicação, combinam calor brando com cavitação acústica. Esse efeito sinérgico pode romper as estruturas celulares e potencializar a extração de compostos intracelulares, incluindo peptídeos e enzimas, aumentando, em última análise, as propriedades funcionais (LUO *et al.*, 2026; ZHAO *et al.*, 2024).

Uma lacuna substancial de conhecimento persiste sobre como processos específicos de tecnologia de alimentos — como a desnaturação térmica *versus* a cavitação mecânica — impulsionam de forma diferencial a bioatividade dessas preparações no ecossistema intestinal. Portanto, este estudo utilizou um modelo de fermentação colônica humana *in vitro* para comparar as assinaturas funcionais de sucos de acerola pós-bióticos produzidos com tratamento térmico (80 °C) e termossonicação (60 °C). O objetivo principal foi elucidar como as modificações da matriz induzidas pelo processamento moldam a sucessão ecológica global e os produtos finais primários da fermentação (ou seja, perfis de AGCCs) da microbiota intestinal humana, um aspecto importante da eficácia pós-biótica (YOLMEH *et al.*, 2026).

5.2 Materiais e métodos

5.2.1 Preparo do suco

O suco de acerola foi preparado reconstituindo-se polpa de acerola congelada,

pasteurizada e sem conservantes (Nossa Fruta Brasil®, Fortaleza, Brasil) em água potável na proporção de 1:2 (m/v).

5.2.2 Preparo e enumeração do inóculo de *L. casei*

Culturas de estoque de *L. casei* NRRL B-442 (USDA, Peoria, IL, EUA) foram ativadas em caldo MRS (30 °C, 16 h) para atingir uma densidade inicial de 9,0 log UFC/mL. A viabilidade probiótica foi avaliada utilizando-se a técnica de plaqueamento em microgotas (Herigstad *et al.*, 2001), na qual 10 µL das diluições apropriadas foram plaqueadas em triplicata em ágar MRS. Apenas os quadrantes contendo entre 3 e 30 colônias foram considerados para a enumeração.

5.2.3 Fermentação do suco de acerola

O suco de acerola, ajustado para o pH 5,5 e suplementado com glicose (50 g/L), serviu como substrato de fermentação. Frascos Schott estéreis (500 mL) contendo 400 mL do suco foram inoculados com 1% de *L. casei*. A fermentação foi conduzida sob condições estáticas a 30 °C por 20 h.

5.2.4 Termossonicação (TS)

A termossonicação (TS), aplicada como uma tecnologia emergente de processamento híbrido que acopla cavitação acústica a um aquecimento brando, foi realizada em alíquotas de 150 mL de suco de acerola fermentado em um reator de vidro encamisado com capacidade para 250 mL (89 mm de altura e 69,5 mm de diâmetro, Sigma-Aldrich Co., St. Louis, MO, EUA). A temperatura do suco foi mantida a 60 ± 2 °C utilizando um banho-maria externo. A temperatura de 60 °C foi selecionada com base em um estudo prévio de otimização para a produção de suco de acerola pós-biótico (NASCIMENTO *et al.*, 2025). As amostras foram sonicadas por 10 min utilizando um sistema de ultrassom do tipo sonda (modelo USD500, 18 kHz, Unique Group, Indaiatuba, SP, Brasil) equipado com uma sonda de titânio de 13 mm submersa 1,5 cm no líquido. O equipamento foi operado em modo contínuo a 100% de amplitude nominal (potência nominal aplicada de 500 W). Essa configuração forneceu uma densidade de potência volumétrica de 3300 W/L, uma intensidade ultrassônica de 373 W/cm² irradiada a partir

da superfície da sonda e uma densidade total de energia acústica de 2000 J/mL. Imediatamente após o processamento, as amostras foram rapidamente resfriadas em banho de gelo.

5.2.5 Processamento térmico (TH)

Amostras de suco fermentado (100 mL) foram processadas em banho-maria (SOLAB, São Paulo, Brasil) a 80 ± 2 °C por 10 min. O tratamento térmico a 80 °C foi escolhido por representar uma condição de pasteurização padrão e escalável, amplamente adotada na indústria de sucos de frutas, estabelecendo uma linha de base realista para a transposição comercial. Imediatamente após o processamento, as amostras foram submersas em banho de gelo. As quatro formulações de sucos avaliadas são apresentadas na Tabela 1.

Tabela 1 – Sucos de acerola potencialmente pós-bióticos processados por calor e termossonicação

Codificação da amostra	Descrição
CONTROLE	Suco de acerola natural (suco não fermentado)
PRO	Suco de acerola probiótico (fermentado não processado)
TS-60	Suco de acerola pós-biótico (fermentado e submetido a processamento por ultrassom a 60 °C)
TH-80	Suco de acerola pós-biótico (fermentado e submetido a processamento térmico a 80 °C)

Fonte: Elaborada pelo autor (2026).

5.2.6 Digestão *in vitro*

As quatro formulações foram submetidas à digestão *in vitro* seguindo o protocolo padronizado INFOGEST 2.0 (Brodkorb *et al.*, 2019). Os ensaios foram realizados utilizando-se 37,5 mL da amostra em um biorreator semidinâmico (BIO-TEC-PRO®, Tecnal) a 37 °C e 150 rpm. As composições dos fluidos simulados estão listadas na Tabela 2.

Tabela 2 – Composição química dos fluidos utilizados na digestão simulada.

Soluções	Fluido Salivar	Fluido Gástrico	Fluido Intestinal
	Simulado (FSS) pH	Simulado (FGS) pH	Simulado (FIS) pH
	7/mM	3/mM	7/mM
KCl	15,1	6,9	6,8
KH ₂ PO ₄	3,7	0,9	0,8
NaHCO ₃	6,8	12,5	85
NaCl	–	11,8	38,4
MgCl ₂ (H ₂ O) ₆	0,5	0,4	0,33
(NH ₄) ₂ CO ₃	0,06	0,5	–
HCl	0,09	1,3	8,4
CaCl ₂ (H ₂ O) ₂	0,025	0,005	0,6

Fonte: Elaborada pelo autor (2026).

A digestão simulada consistiu em três fases sequenciais. Inicialmente, a fase oral (2 min) foi preparada combinando 37,5 mL da amostra com 30 mL de Fluido Salivar Simulado (FSS), 187,5 µL de CaCl₂ 0,3 M e água destilada suficiente para atingir 75 mL após o ajuste do pH para 7,0 (NaOH 3 M). Subsequentemente, a fase gástrica (2 h) foi iniciada pela adição de 60 mL de Fluido Gástrico Simulado (FGS) ao bolo oral e ajuste do pH para 3,0 (HCl 5 M). Pepsina (2000 U/mL; Sigma P7000) e CaCl₂ foram adicionados, e o volume foi ajustado para 150 mL. Por fim, na fase intestinal (2 h), o quimo gástrico foi misturado com Fluido Intestinal Simulado (FIS), pancreatina (100 U/mL; Sigma P3292), sais biliares (10 mM; Sigma B8756) e CaCl₂ em pH 7,0 (NaOH 3 M). O volume final da reação foi ajustado para 300 mL com água destilada.

5.2.7 Inóculo fecal

O procedimento experimental foi submetido e aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal do Ceará (CEP/UFC, CAAE 77129623.8.0000.5054, 20/02/2024). Amostras fecais foram coletadas de oito doadores saudáveis, mediante assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE). Os critérios de exclusão incluíram ser fumante, ter doenças metabólicas ou gastrointestinais, ou uso recente de antibióticos, prebióticos ou suplementos probióticos. Um total de 100 g de amostras fecais agrupadas (*pool*) foi diluído (1:2) em solução salina tamponada com

fosfato estéril (PBS, 0,1 M, pH 7,0). A mistura foi homogeneizada e filtrada, e a condição anaeróbica foi alcançada pela aspersão de N₂ estéril (100%). O filtrado foi então centrifugado duas vezes a $6.000 \times g$ por 10 min a 4 °C. O *pellet* resultante foi ressuspenso em PBS estéril e combinado com 25% de glicerol (1:1), congelado rapidamente em nitrogênio líquido e armazenado a -80 °C até o uso. A utilização de amostras fecais humanas agrupadas de múltiplos doadores para a fermentação colônica *in vitro* serviu para minimizar a variabilidade interdoadores, proporcionando o estabelecimento de um consórcio microbiano mais uniforme e equilibrado para a análise subsequente (Warda *et al.*, 2021).

5.2.8 Fermentação colônica *in vitro*

A fermentação colônica dos sucos de acerola digeridos (Controle, PRO, TS-60 e TH-80) foi realizada em um reator sob condições anaeróbicas (injeção de N₂ 100%), seguindo as condições de Reges *et al.* (2023). O volume final da mistura no reator foi ajustado para 250 mL, contendo 1% do inóculo fecal (Seção 2.7). O pH foi mantido em 7,0 durante o período de 48 h de fermentação (NaOH 1 M, HCl 1 M). As amostras foram coletadas nos tempos 0, 24 e 48 h, e centrifugadas ($6.000 \times g$, 4 °C, 10 min). O sobrenadante foi utilizado para quantificar compostos fenólicos, ácidos orgânicos, ácidos graxos de cadeia curta (AGCCs) e glicose. O *pellet* (microbiota fecal) foi congelado para posterior sequenciamento do rRNA 16S.

5.2.9 Análise da microbiota fecal

O DNA foi extraído utilizando o DNeasy® PowerSoil® Pro Kit (Qiagen, CA, EUA) a partir de 250 mg de cada amostra fecal (coletada em 0 h e 48 h de fermentação colônica). O gene rRNA 16S foi amplificado utilizando *primers* específicos (515F-Y e 806R). O sequenciamento de alto rendimento do gene rRNA 16S (300 ciclos, 2×150 pb) foi realizado com o kit de reagentes MiSeq v2 na plataforma Illumina MiSeq (Illumina Inc., EUA). As análises de bioinformática foram realizadas na plataforma Illumina Base Scope utilizando *pipelines* internos. A Illumina utiliza o sistema de pontuação de qualidade Phred durante o sequenciamento, especificamente $Q \geq 30$ (99,9% de precisão). As sequências foram submetidas ao NCBI sob o Bioproject PRJNA1224924.

A classificação taxonômica foi conduzida utilizando o *pipeline* DADA2 e o banco

de dados Greengenes. As estimativas de diversidade e riqueza foram calculadas utilizando o *software* EstimateS (versão 9.1.0) para determinar os índices de Chao1, Shannon e Simpson (CHAO; BUNGE, 2002; SHANNON, 1948; SIMPSON; CAMPBELL, 2015).

5.2.10 Determinação de açúcares e ácidos orgânicos

A quantificação de AGCCs, ácidos orgânicos e glicose foi realizada em um sistema HPLC Agilent Technologies Infinity 1260, conforme descrito por Linhares *et al.* (2025). Dois métodos cromatográficos distintos foram empregados. Para a análise dos ácidos ascórbico, acético, láctico, butírico, isobutírico e propiônico, a separação foi obtida em uma coluna Aminex HPX-87H (300 × 7,8 mm, Bio-Rad) a 50 °C. A fase móvel foi ácido sulfúrico 5 mM a uma taxa de fluxo de 0,4 mL/min, com detecção por UV-DAD a 210 nm. O tempo total de corrida foi de 40 min. Para a quantificação de glicose, o sistema foi equipado com uma coluna Supelco Ca (300 × 7,8 mm) a 80 °C. A fase móvel foi água ultrapura (0,5 mL/min), com um tempo de corrida de 30 min. A detecção foi realizada utilizando-se um detector de índice de refração (IR) a 35 °C.

5.2.11 Compostos fenólicos totais

O micrométodo de Folin-Ciocalteu adaptado (Oliveira *et al.*, 2018) foi utilizado para avaliar o conteúdo de fenólicos totais (CFT). Resumidamente, em uma placa de 96 poços, 10 µL de cada amostra foram misturados com 200 µL do reagente de Folin-Ciocalteu (diluído 1:10) e incubados por 3 min (25 °C, no escuro). Subsequentemente, 100 µL de solução de Na₂CO₃ a 4% foram adicionados a cada poço. Após uma incubação final, a absorbância foi lida a 765 nm. A quantificação foi realizada com base em uma curva-padrão de ácido gálico (GA), e o CFT foi expresso em g GAE/L.

5.2.12 Análise estatística

Todas as análises foram realizadas em triplicata. Para a estatística univariada, os dados foram submetidos à Análise de Variância (ANOVA) seguida pelo teste *post-hoc* de Tukey ($p < 0,05$). Essa análise foi realizada utilizando o *software* Statistica™ (TIBCO, StatSoft 14.3.0, Tulsa, OK, EUA). A análise multivariada da abundância taxonômica alvo e dos ácidos orgânicos foi realizada utilizando o *software* MetaboAnalyst 6.0 (Xia Lab,

McGill University, Montreal, QC, Canadá). Para corrigir a multiplicidade de testes nas abundâncias relativas taxonômicas, os valores de p foram ajustados utilizando a correção da taxa de falsa descoberta (FDR) de Benjamini-Hochberg, empregando o protocolo descrito por Pereira *et al.* (2022).

A Análise de Componentes Principais (PCA) foi realizada após o escalonamento dos dados (centrados na média e divididos pelo desvio padrão de cada variável), e os dois primeiros componentes principais (2 PC) foram utilizados para a avaliação. A Análise Discriminante por Mínimos Quadrados Parciais (PLS-DA) também foi conduzida, e as variáveis com um escore de Importância da Variável na Projeção (VIP) superior a 1,0 foram consideradas significativas. *Heatmaps* (mapas de calor) também foram obtidos para a visualização dos dados (AKARACHANTACHOTE *et al.*, 2014).

5.3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.3.1 Estabilidade durante a digestão simulada

A amostra probiótica (PRO) apresentou inicialmente uma população de $11,1 \pm 0,5$ Log UFC/mL (Tabela 3). Após a digestão, observou-se uma redução significativa de 3,5 Log UFC/mL, um declínio consistente com a conhecida suscetibilidade do *Lactobacillus casei* livre à acidez gástrica (ALI *et al.*, 2023; MACIEL DA SILVA *et al.*, 2022). A estratégia de alta inoculação inicial mitigou essas perdas, garantindo a retenção de $7,7 \pm 0,4$ Log UFC/mL ao final da fase intestinal. Por outro lado, os tratamentos TS-60 e TH-80 resultaram em formulações com células não viáveis, mantendo $< 1,0$ Log UFC/mL durante todo o processo, um requisito para preparações pós-bióticas (AKHAVAN *et al.*, 2026; SALMINEN *et al.*, 2021).

Tabela 3 –Contagem celular de *Lacticaseibacillus casei* e concentração de ácido láctico após a digestão *in vitro* em amostras de suco de acerola.

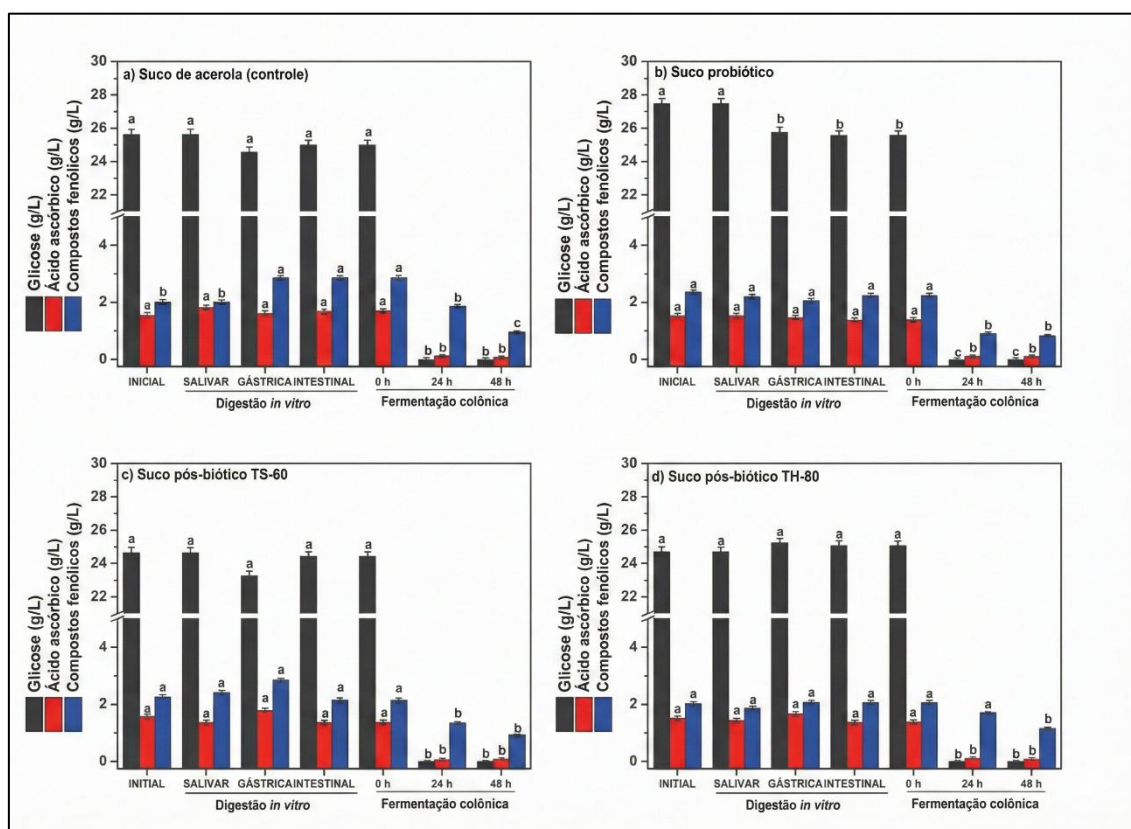
	Viabilidade probiótica (log UFC/mL)		Ácido láctico (g/L)	
	Início da digestão	Final da digestão	Início da digestão	Final da digestão
Controle	0,0±0,0 ^a	0,0±0,0 ^a	0,0±0,0 ^a	0,0±0,0 ^a
Probiótico	11,09±0,10 ^a	7,7±0,10 ^b	6,55±0,3 ^a	6,22±0,3 ^a
Pós-biótico TS-60	0,0±0,0 ^a	0,0±0,0 ^a	6,65±0,3 ^a	6,61±0,3 ^a
Pós-biótico TH-80	0,0±0,0 ^a	0,0±0,0 ^a	6,50±0,3 ^a	6,12±0,3 ^a

Nota: Letras diferentes na mesma linha indicam diferenças estatisticamente significativas ($p < 0,05$).

Fonte: Elaborada pelo autor (2026).

A digestão simulada não degradou significativamente compostos importantes. O ácido láctico ($6,4 \pm 0,5$ g/L), os compostos fenólicos totais ($2,2 \pm 0,1$ g EAG/L) e o ácido ascórbico ($1,35 \pm 0,01$ g/L) permaneceram estáveis em todos os grupos (Figura 1 e Tabela 3), sugerindo que uma alta bioacessibilidade é mantida para a subsequente fase colônica, um fator importante para garantir a bioatividade do pós-biótico (TIAN *et al.*, 2026). Essa estabilidade observada é provavelmente atribuível às condições específicas do modelo estático *in vitro*, o qual exclui as complexas vias de degradação oxidativa e microbiana tipicamente presentes *in vivo* (ODRIOZOLA-SERRANOV *et al.*, 2023; RODRÍGUEZ-ROMERO *et al.*, 2023). Essa resistência uniforme estabelece uma linha de base química consistente para a fermentação colônica subsequente, sugerindo que as diferenças ecológicas a jusante e os produtos finais específicos da fermentação são amplamente atribuíveis às modificações estruturais da matriz induzidas pelo processamento, em vez de uma degradação diferencial.

Figura 1 – Perfis de concentração de compostos fenólicos totais (g EAG/L), glicose (g/L) e ácido ascórbico (g/L) durante a digestão *in vitro* e a fermentação colônica do suco de acerola.



Nota: Os resultados são apresentados como média $\pm$ desvio padrão. Letras diferentes acima das barras indicam uma diferença estatisticamente significativa ao longo das fases de digestão/fermentação colônica para cada variável dentro do mesmo tratamento (teste de Tukey, $p < 0,05$).

Fonte: Elaborada pelo autor (2026).

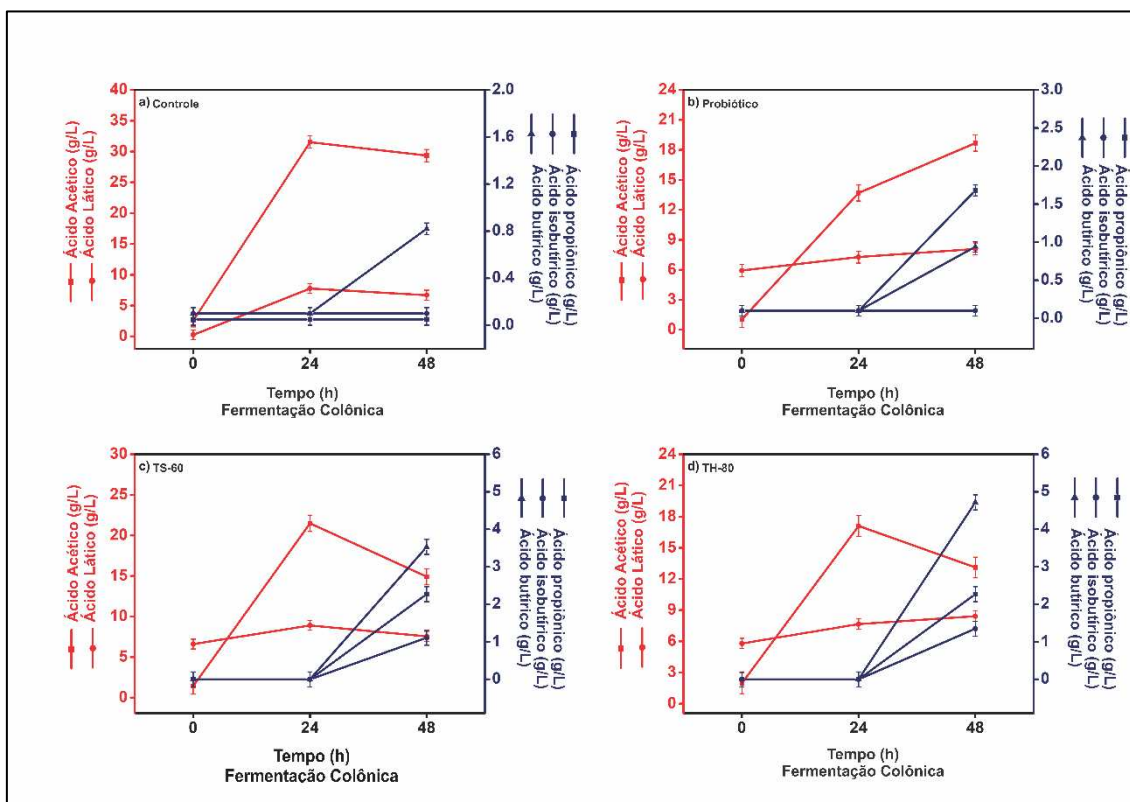
5.3.2 Perfil metabólico durante a fermentação colônica

O perfil metabólico ao longo do período de fermentação de 48 h demonstrou uma preferência de substrato distinta dentro do consórcio microbiano. As primeiras 24 h apresentaram depleção completa de glicose (de 25 g/L para 0,0 g/L), resultando em um aumento concomitante na produção de lactato e acetato (Figuras 1 e 2) utilizando vias heterofermentativas ou homofermentativas (MARKOWIAK-KOPEĆ; ŚLIŻEWSKA, 2020). Essa mudança metabólica é consistente com o consumo preferencial de carboidratos simples descrito por ARMET *et al.* (2022). Após o esgotamento da glicose, o metabolismo microbiano mudou para o uso de substratos complexos, como fibras residuais e compostos fenólicos.

Após 48 h, uma degradação substancial de compostos fenólicos e ácido ascórbico foi medida em todos os grupos ($p < 0,05$). O grupo controle obteve uma taxa de degradação de 67%, que foi significativamente maior do que os 44,7% observados no tratamento TH-80. Esses resultados destacam o potencial prebiótico dos fenólicos da acerola na composição da microbiota (LINHARES *et al.*, 2025; PLAMADA; VODNAR, 2021), embora o processamento térmico pareça influenciar sua fermentabilidade. Isso sugere que, em matrizes pós-bióticas, a microbiota metabolizou preferencialmente componentes intracelulares prontamente disponíveis liberados pela lise celular e fibras termicamente despolimerizadas, em vez de depender exclusivamente do catabolismo fenólico complexo (PIMENTEL *et al.*, 2023). Esse comportamento é consistente com a hierarquia de utilização de substratos, na qual as bactérias intestinais priorizam fontes de energia prontamente fermentáveis em detrimento de estruturas polifenólicas complexas (OLIPHANT; ALLEN-VERCOE, 2019).

A análise quantitativa da produção de AGCC (Ácidos Graxos de Cadeia Curta) evidenciou uma clara hierarquia metabólica (Controle < PRO < TS-60 < TH-80), indicando que o método de inativação é um importante determinante da fermentação colônica (Figura 2). O perfil direcionado de AGCCs primários destaca-se como um forte indicador ecológico da bioatividade e da capacidade metabólica microbiana em matrizes fermentadas complexas (RODRIGUES DE PAIVA *et al.*, 2025). O controle não gerou quantidades detectáveis de propionato ou isobutirato. De forma similar, a fermentação colônica do suco probiótico (PRO) apresentou capacidade metabólica limitada. A introdução de *Lactocaseibacillus casei* viável, um produtor primário de ácido lático, no sistema colônico simulado foi insuficiente para impulsionar uma butirogênese significativa, rendendo apenas $0,94 \pm 0,08$ g/L de butirato. Por outro lado, o tratamento TH-80 forneceu componentes da parede celular acessíveis e termicamente desnaturados que alimentam diretamente os produtores secundários de butirato. As células metabolicamente ativas no grupo PRO provavelmente competiram com a microbiota endógena por açúcares simples residuais, falhando em fornecer os substratos estruturais complexos necessários para estimular a rede de alimentação cruzada (*cross-feeding*) (MARKOWIAK-KOPEĆ; ŚLIŻEWSKA, 2020).

Figura 2 – Produção de ácido lático e ácidos graxos de cadeia curta (AGCCs) (acético, propiônico, isobutírico e butírico) ao longo de 48 h de fermentação colônica *in vitro*.



Fonte: Elaborada pelo autor (2026).

Embora o tratamento TS-60 tenha induzido um perfil metabólico de alto rendimento ($2,27 \pm 0,18$ g/L de propionato e $3,53 \pm 0,28$ g/L de butirato), o tratamento TH-80 resultou em uma fermentação colônica com maior produção metabólica. O suco processado termicamente rendeu concentrações máximas de butirato ($4,72 \pm 0,38$ g/L) e ácido isobutírico ($1,35 \pm 0,11$ g/L), mantendo níveis de propionato ($2,27 \pm 0,15$ g/L) equivalentes aos obtidos com o suco TS-60. Esse resultado diferencial indica como o mecanismo físico da tecnologia aplicada – cavitação acústica *versus* intensa desnaturação térmica – altera seletivamente a bioacessibilidade dos componentes da matriz, modulando diretamente os produtos finais da fermentação (M. WU *et al.*, 2025).

Esse acúmulo de butirato serviu como um forte indicador de uma eficiente rede metabólica de alimentação cruzada (*cross-feeding*), sugerindo que metabólitos primários (como lactato e acetato) foram convertidos com sucesso por fermentadores secundários na fermentação colônica. Isso é consistente com o conceito de probióticos inativados pelo calor (tindalizados), no qual o tratamento térmico rompe a integridade celular para liberar componentes bacterianos específicos (PIQUÉ *et al.*, 2019) que alimentam táxons

produtores de butirato, impulsionando fortes interações ecológicas e moldando o perfil direcionado de AGCCs.

A medição de isobutirato ($1,35 \pm 0,11$ g/L) na fermentação colônica do suco TH-80 indica a fermentação ativa de aminoácidos de cadeia ramificada (BCAA, valina) (RIOS-COVIAN *et al.*, 2020). Embora outros marcadores do metabolismo proteolítico, como valerato e isovalerato, não tenham sido quantificados devido a limitações metodológicas, a produção significativa apenas de isobutirato já é um importante biomarcador. Esses resultados indicam que o tratamento térmico, além de inativar as células, também facilitou a liberação de proteínas bacterianas da biomassa lisada, servindo como substrato para a proteólise. Embora a medição do isobutirato possa parecer contradizer a hipótese de disponibilidade limitada de nitrogênio, ela demonstra uma mudança qualitativa no metabolismo do nitrogênio.

No TH-80, o alto rendimento de butirato ($4,72 \pm 0,38$ g/L) e a presença de complexos proteína-polifenol sugerem que os compostos nitrogenados foram processados por meio de uma rede de alimentação cruzada estável e integrada. Essa proteólise regulada sustentou o aumento da abundância relativa de táxons benéficos sem a toxicidade metabólica ou a expansão de patobiontes frequentemente associada à rápida fermentação de peptídeos em estados disbióticos. Dada a alta carga de biomassa inicial (10^{11} UFC/mL), isso sugere que o tratamento térmico favoreceu uma via metabólica na qual bactérias comensais, como o *Bacteroides*, degradaram proteínas bacterianas complexas, produzindo AGCR (Ácidos Graxos de Cadeia Ramificada) sem desencadear a disbiose inflamatória relacionada à rápida fermentação de peptídeos observada no grupo TS-60 (DIETHER; WILLING, 2019).

A distinção fundamental entre TS-60 e TH-80 reside no contexto ecológico: enquanto a termossonicação (TS-60) favoreceu patobiontes como o *Fusobacterium* – bem documentado por seu metabolismo rápido e putrefativo de aminoácidos (BRENNAN; GARRETT, 2019; DIETHER; WILLING, 2019), a fermentação de proteínas no TH-80 ocorreu em um ambiente dominado por comensais sacarolíticos e fortes candidatos a probióticos de próxima geração (NGP). No TH-80, a alta produção de butirato e a formação de complexos proteína-polifenol induzidos pelo calor provavelmente modularam a cinética de liberação de nitrogênio (PIQUÉ *et al.*, 2019), permitindo assim uma proteólise integrada que sustenta a diversidade funcional sem os riscos de uma fermentação rápida e não controlada de proteínas tipicamente associada à disbiose (RIOS-COVIAN *et al.*, 2020; WINDEY *et al.*, 2012).

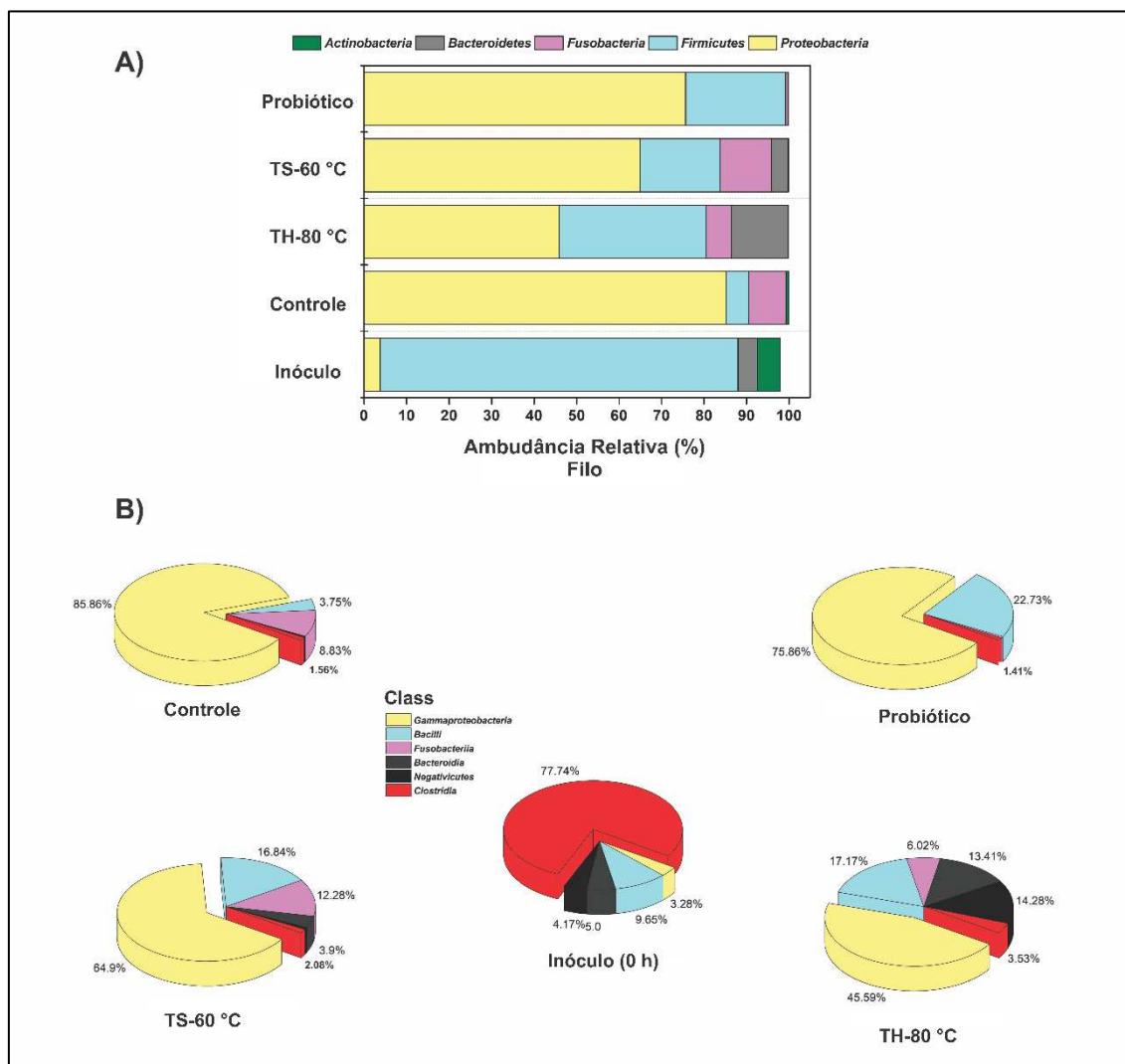
Esse perfil metabólico confere vantagens fisiológicas potencialmente sinérgicas. O butirato atua como a fonte de energia primária para os colonócitos, reforçando a integridade da barreira epitelial (SABAN GÜLER *et al.*, 2025); o propionato regula o metabolismo lipídico hepático (LANGFELD *et al.*, 2021) e o isobutirato facilita a absorção de eletrólitos enquanto mantém a fluidez da membrana intestinal (RANRESSLER *et al.*, 2014). Além de sua função trófica, evidências recentes indicam que ácidos graxos de cadeia ramificada, como o isobutirato, promovem a SUMOilação de proteínas da matriz nuclear nos colonócitos. Esse processo reduz a expressão de citocinas pró-inflamatórias e fortalece as junções de oclusão (*tight junctions*), reforçando, assim, a integridade da barreira epitelial (EZZINE *et al.*, 2022).

Embora o modelo *in vitro* careça do epitélio do hospedeiro, a alta produção de butirato medida na amostra TH-80 sugere um potencial significativo para a supressão de patógenos *in vivo*. *In vivo*, a oxidação do butirato pelos colonócitos consome oxigênio, mantendo a hipóxia epitelial (BYNDLOSS *et al.*, 2017). Esse mecanismo fisiológico – impossível de ser replicado em culturas em batelada *in vitro* – suprimiria predominantemente a expansão de anaeróbios facultativos como as *Proteobacteria* (por exemplo, *Salmonella ssp.*, *E. coli ssp.*), que dependem da respiração de oxigênio ou nitrato para prosperar no lúmen intestinal (RIVERA-CHÁVEZ *et al.*, 2016). Portanto, o perfil metabólico do pós-biótico TH-80 oferece um mecanismo duplo de proteção: acidificação direta e a potencial restauração da hipóxia epitelial (no contexto *in vivo*).

5.3.3 Influência do método de inativação na microbiota colônica

A análise da abundância da microbiota intestinal demonstrou perfis distintos de segurança e eficácia. A fermentação colônica do suco controle (suco de acerola) resultou em uma predominância do filo *Proteobacteria* (85,2%), especificamente da classe *Gammaproteobacteria* (84,9%) (Figura 3). Essa expansão de *Proteobacteria* serve como um biomarcador comum para instabilidade ecológica e alto potencial pró-inflamatório (M. ZHAO *et al.*, 2023). Concomitantemente, a abundância de filos benéficos como *Firmicutes* e *Bacteroidetes* diminuiu (5,28% e 0,07%, respectivamente) (Figura 3A) (FUSCO *et al.*, 2023).

Figura 3 – Abundância relativa (%) da microbiota fecal no nível de A) filo e B) classe após 48 h da fermentação colônica do suco de acerola digerido.



Fonte: Elaborada pelo autor (2026).

Por outro lado, o suco potencialmente pós-biótico TH-80 neutralizou efetivamente essa mudança disbiótica. Após 48 h, a menor abundância relativa de *Proteobacteria* (45,9%) foi encontrada entre todos os tratamentos, juntamente com a maior abundância dos filos benéficos *Firmicutes* (34,5%) e *Bacteroidetes* (13,3%) (Figura 3A). O tratamento TH-80 favoreceu a expansão das classes *Bacteroidia* (13,2%), *Bacilli* (16,9%) e, mais notavelmente, *Negativicutes* (14,1%) (Figura 3B).

Esse enriquecimento corrobora o estabelecimento de uma simbiose específica impulsionada pelo succinato. Nessa rede cooperativa, a inativação térmica gera células lisadas ricas em glicanos complexos da parede celular (peptidoglicano), um substrato preferencial para *Bacteroides* (que aumentou na amostra TH-80) (PIQUÉ *et al.*, 2019).

Durante a degradação desses polímeros complexos, o *Bacteroides* tipicamente excreta succinato como um intermediário metabólico (WEXLER, 2007). Esse succinato provavelmente serviu como fonte de carbono obrigatória para a *Phascolarctobacterium* (um *Negativicutes* enriquecido neste grupo), que o converte em propionato utilizando a via do metilmalonil-CoA (IKEYAMA *et al.*, 2020; REICHARDT *et al.*, 2014). Embora o acúmulo transitório de succinato ou a expressão de enzimas intracelulares não tenham sido quantificados diretamente, a avaliação dessas etapas moleculares intermediárias é secundária ao resultado tecnológico funcional. A literatura indica que, em redes sintróficas eficientes, esse intermediário é rapidamente consumido por fermentadores secundários quase tão rapidamente quanto é produzido (IKEYAMA *et al.*, 2020; LOUIS; FLINT, 2017). Portanto, a forte coocorrência taxonômica desses táxons específicos, aliada à alta concentração do produto final da fermentação ($2,27 \pm 0,15$ g/L de propionato), indica uma forte assinatura ecológica dessa rede de alimentação cruzada (*cross-feeding*), validando a eficácia da abordagem de engenharia de matriz.

Uma divergência distinta foi observada no suco tratado por TS-60. Diferentemente do tratamento térmico, a termossonicação favoreceu a abundância relativa de *Fusobacteria* (12,2%) e de sua classe correspondente, *Fusobacteriia* (Figura 3). Sugere-se que a modificação da matriz impulse essa mudança. O ultrassom extrai proteínas e peptídeos intracelulares de forma eficiente por meio da cavitação (F. ZHAO *et al.*, 2024), tornando-os potencialmente mais bioacessíveis em comparação às matrizes processadas termicamente. Dado que as espécies de *Fusobacterium* são tipicamente proteolíticas e prosperam à base de peptídeos e aminoácidos intracelulares (SAKANAKA *et al.*, 2022), o ambiente rico em proteínas da matriz do TS-60 provavelmente conferiu uma vantagem nutricional competitiva.

Embora a lise celular tenha sido analisada microscopicamente, os perfis ecológicos divergentes sugerem que ocorreram modificações de matriz distintas. O perfil do TS-60 (*Fusobacterium* proteolítico) é consistente com a liberação de peptídeos acessíveis pela cavitação mecânica (SAKANAKA *et al.*, 2022; F. ZHAO *et al.*, 2024), ao passo que o perfil do TH-80 (*Bacteroides* degradadores de glicanos) é consistente com a liberação de polímeros complexos da parede celular pela permeabilização térmica (PIQUÉ *et al.*, 2019). Assim, a própria microbiota atuou como um sensor biológico para o tipo de nutriente liberado por cada tecnologia, tornando a assinatura ecológica o principal indicador funcional para essas modificações da matriz.

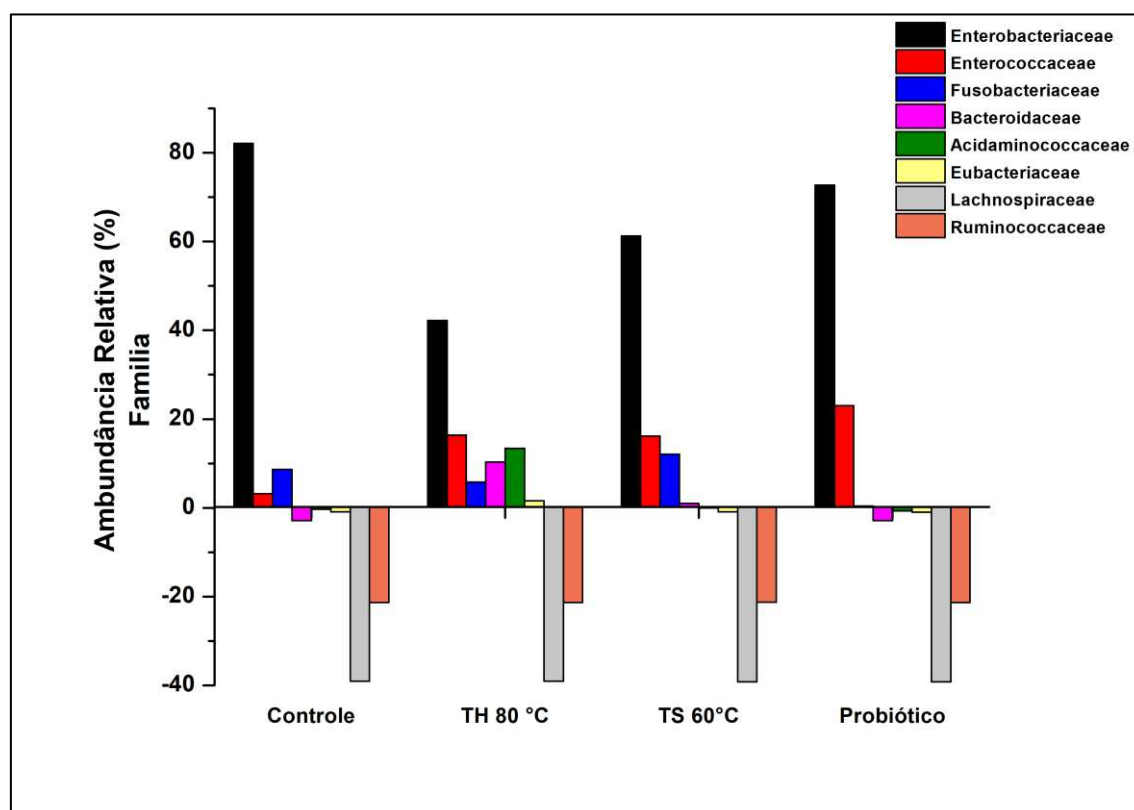
No entanto, é importante reconhecer que a expansão do filo proteolítico

Fusobacteria observada no grupo TS-60 pode ser acentuada pelas limitações do modelo estático de digestão *in vitro* utilizado (INFOGEST sem diálise) (BRODKORB *et al.*, 2019). *In vivo*, os peptídeos de baixo peso molecular e os aminoácidos livres liberados pela lise ultrassônica seriam provavelmente absorvidos no intestino delgado antes de atingir o cólon. Portanto, embora o TS-60 aumente a bioacessibilidade de proteínas, o risco disbiótico pode estar superestimado em comparação com um cenário fisiológico no qual a absorção pelo hospedeiro regula a disponibilidade de nitrogênio (LUCAS-GONZÁLEZ *et al.*, 2018).

Por outro lado, o tratamento térmico na matriz TH-80 pode ter induzido modificações estruturais que facilitam as interações entre proteínas desnaturadas e compostos fenólicos (JAKOBEK, 2015). Esses complexos proteína-fenólico poderiam reduzir a suscetibilidade das proteínas à hidrólise microbiana (OZDAL *et al.*, 2013), regulando, assim, a bioacessibilidade do nitrogênio e garantindo que sua fermentação ocorresse dentro de um contexto eubiótico integrado, em vez de atuar como um propulsor isolado para patobiontes oportunistas.

A análise taxonômica em nível de família elucidou mecanismos específicos subjacentes a essas mudanças (Figura 4). A análise dos dados de variação da abundância (0 a 48 h) revelou uma diminuição uniforme nas famílias nativas produtoras de butirato (*Lachnospiraceae* e *Ruminococcaceae*) em todas as amostras, gerando um ambiente permissivo para novos colonizadores transitórios. Consequentemente, a segurança e a eficácia de cada intervenção com os sucos mostraram-se influenciadas pelos padrões específicos de sucessão microbiana que impulsionaram a subsequente reocupação do nicho.

Figura 4 – Variações na abundância relativa (%) de famílias bacterianas após 48 h de fermentação em comparação com o inóculo inicial (0 h).



Fonte: Elaborada pelo autor (2026).

No grupo Controle, a família *Enterobacteriaceae* apresentou o maior incremento de abundância relativa (+82,14%) (Figura 4). Este achado corrobora o perfil disbiótico previamente observado e é consistente com um perfil metabólico dominado pelo ácido acético (SORBARA; PAMER, 2018). O suco probiótico, apesar de promover o maior aumento na abundância da família *Enterococcaceae* (+23,06%), não conseguiu exercer exclusão competitiva, permitindo ainda uma expansão crítica de *Enterobacteriaceae* (+72,75%) (Figura 4).

Reconhece-se também que o modelo estático de digestão *in vitro* não simula ativamente a absorção mucosa (BRODKORB *et al.*, 2019; LUCAS-GONZÁLEZ *et al.*, 2018). Consequentemente, carboidratos simples e nutrientes que seriam tipicamente absorvidos no intestino delgado são transportados para a fase colônica. Este acúmulo de substratos prontamente fermentáveis pode ter exacerbado a proliferação de *Proteobacteria* de crescimento rápido observadas nos grupos Controle e Probiótico, criando um ambiente artificialmente desafiado (simulando um estado disbiótico com alto teor de açúcar) (SHIN *et al.*, 2015).

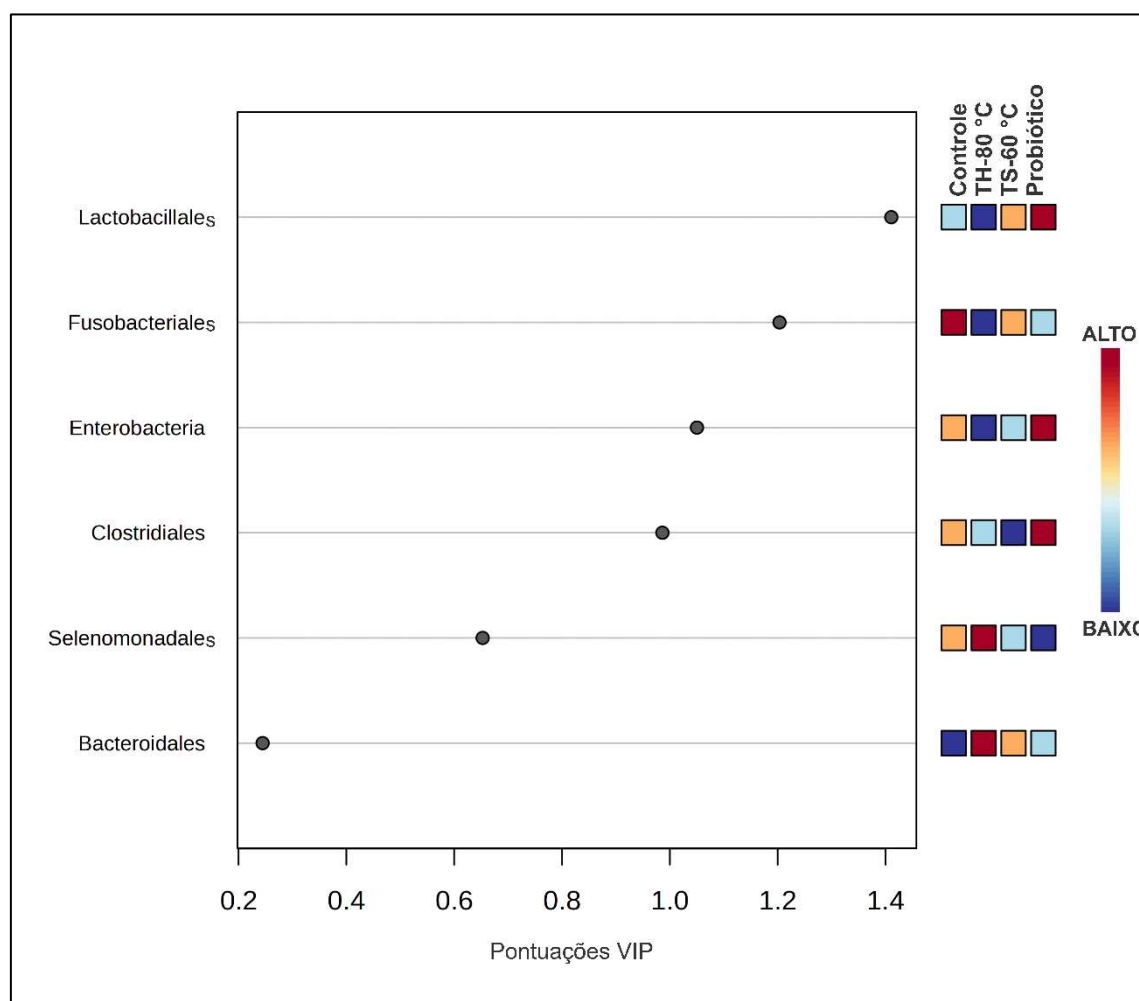
Notavelmente, mesmo sob essas condições altamente permissivas para o crescimento de patógenos, o pós-biótico TH-80 se destacou por impulsionar uma sucessão ecológica alternativa e benéfica, sendo o único tratamento capaz de estimular significativamente a família *Acidaminococcaceae* (+13,41%) e recuperar a família *Bacteroidaceae* (+10,34%), enquanto manteve o menor crescimento de *Enterobacteriaceae* (+42,23%) (Figura 4). Esta estrutura da comunidade sugere o estabelecimento de uma relação sintrófica na qual a família *Acidaminococcaceae* provavelmente converteu lactato/succinato em propionato e butirato, um mecanismo corroborado pelos dados metabólicos (Figura 2). A coexistência com a família *Enterococcaceae* (+16,36% no TH-80) reforça a hipótese de alimentação cruzada (*cross-feeding*), na qual o lactato produzido pelo gênero *Enterococcus* pode servir como substrato para a *Acidaminococcaceae*, prevenindo a acidificação excessiva do meio que, de outra forma, favoreceria patógenos (LOUIS; FLINT, 2017).

Finalmente, a análise em nível de família confirmou que as alterações taxonômicas no grupo TS-60 foram impulsionadas pela família *Fusobacteriaceae* (+12,1%). Esses dados suportam a hipótese de que a matriz proteica modificada por ultrassom, provavelmente menos complexada com fenólicos do que a matriz térmica, forneceu uma vantagem competitiva para especialistas proteolíticos (ZHAO *et al.*, 2024).

5.3.4 Táxons discriminantes e análise multivariada

Para delinear os táxons específicos que diferenciaram os tratamentos, foi realizada uma análise do escore de Importância da Variável na Projeção (VIP) (Figura 5). A análise quantitativa VIP indicou que todas as amostras forneceram um efeito protetor, mas os sucos potencialmente pós-bióticos (TH-80 e TS-60) demonstraram efeitos funcionais e metabólicos superiores. Essa distinção dependeu principalmente da capacidade de controlar patógenos oportunistas.

Figura 5 – Escores do gráfico VIP da ordem para microbiota fecal fermentada na presença de suco de acerola digerido.



Fonte: Elaborada pelo autor (2026).

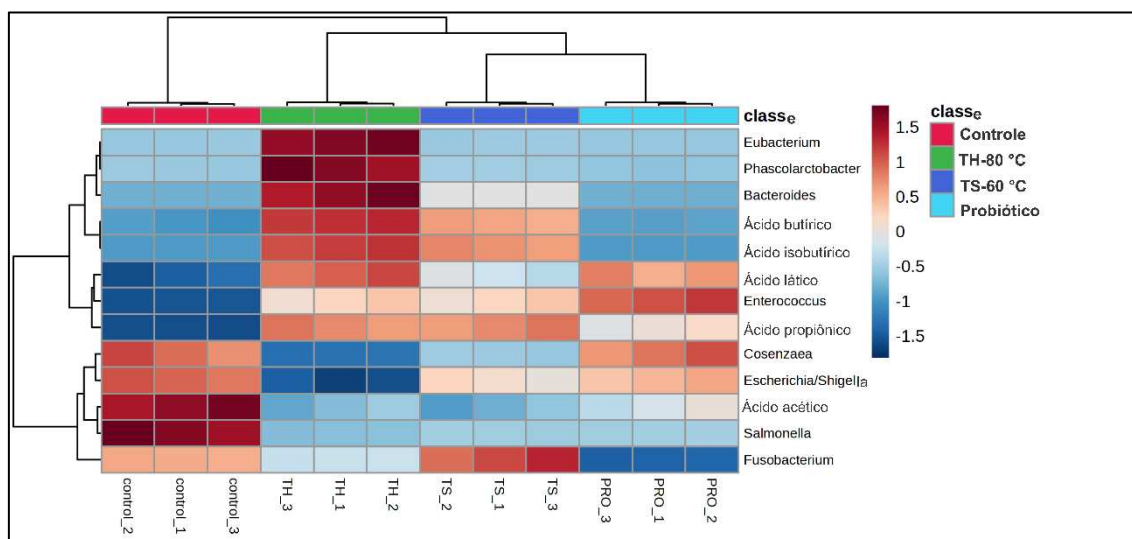
Os sucos potencialmente pós-bióticos (TH-80 e TS-60) exibiram menores abundâncias relativas da ordem *Enterobacteriales* — conhecida por abrigar patógenos oportunistas (VIP $\approx 1,0$). O tratamento TH-80 suprimiu as enterobactérias, ao mesmo tempo em que preservou a comunidade metabólica central de táxons-chave degradadores de fibras e ligados ao butirato (FUSCO *et al.*, 2023), incluindo as ordens *Bacteroidales* (VIP $\approx 0,2$), *Clostridiales* (VIP $\approx 1,0$) e *Selenomonadales* (VIP $\approx 0,6$) (Figura 5). Embora o TS-60 tenha alcançado o controle inicial de patógenos, ele não conseguiu suprimir a ordem *Fusobacteriales* (12,2%) e foi incapaz de manter a comunidade metabólica funcional (Figura 5).

Em contraste, o suco probiótico exibiu uma limitação funcional significativa, falhando em suprimir a ordem *Enterobacteriales* (75,31%). Embora o probiótico tenha

promovido a ordem *Lactobacillales* ($VIP \approx 1,4$; 23,56%) e suprimido a ordem *Fusobacteriales* ($VIP \approx 1,2$), esse benefício não se traduziu no controle de patógenos de amplo espectro e resultou na supressão da comunidade degradadora de fibras (Figura 5).

Além disso, foi conduzida uma análise integrada no nível de gênero e da produção de AGCCs (Figura 6). A análise do mapa de calor (*heatmap*) revelou que o tratamento TH-80 estabeleceu um perfil único caracterizado pela produção de isobutirato (1,35 g/L), butirato (4,72 g/L) e propionato (2,27 g/L). Isso reforça a noção de que a matriz TH-80 atua como um substrato de crescimento seletivo, promovendo um consórcio benéfico dos gêneros *Eubacterium* e *Phascolarctobacterium* (SINGH *et al.*, 2023; WU *et al.*, 2017). Em contrapartida, o TS-60 aumentou o potencial disbiótico por meio do aumento da abundância do gênero *Fusobacterium* (11,87%), enquanto o suco probiótico não conseguiu mitigar a alta abundância do gênero oportunista *Escherichia/Shigella* (11,87%) e exibiu produção limitada de AGCCs (por exemplo, 0,96 g/L de butirato).

Figura 6 – Mapa de calor (*heatmap*) da microbiota fecal em nível de gênero e AGCCs no suco de acerola digerido após 48 h de fermentação colônica.

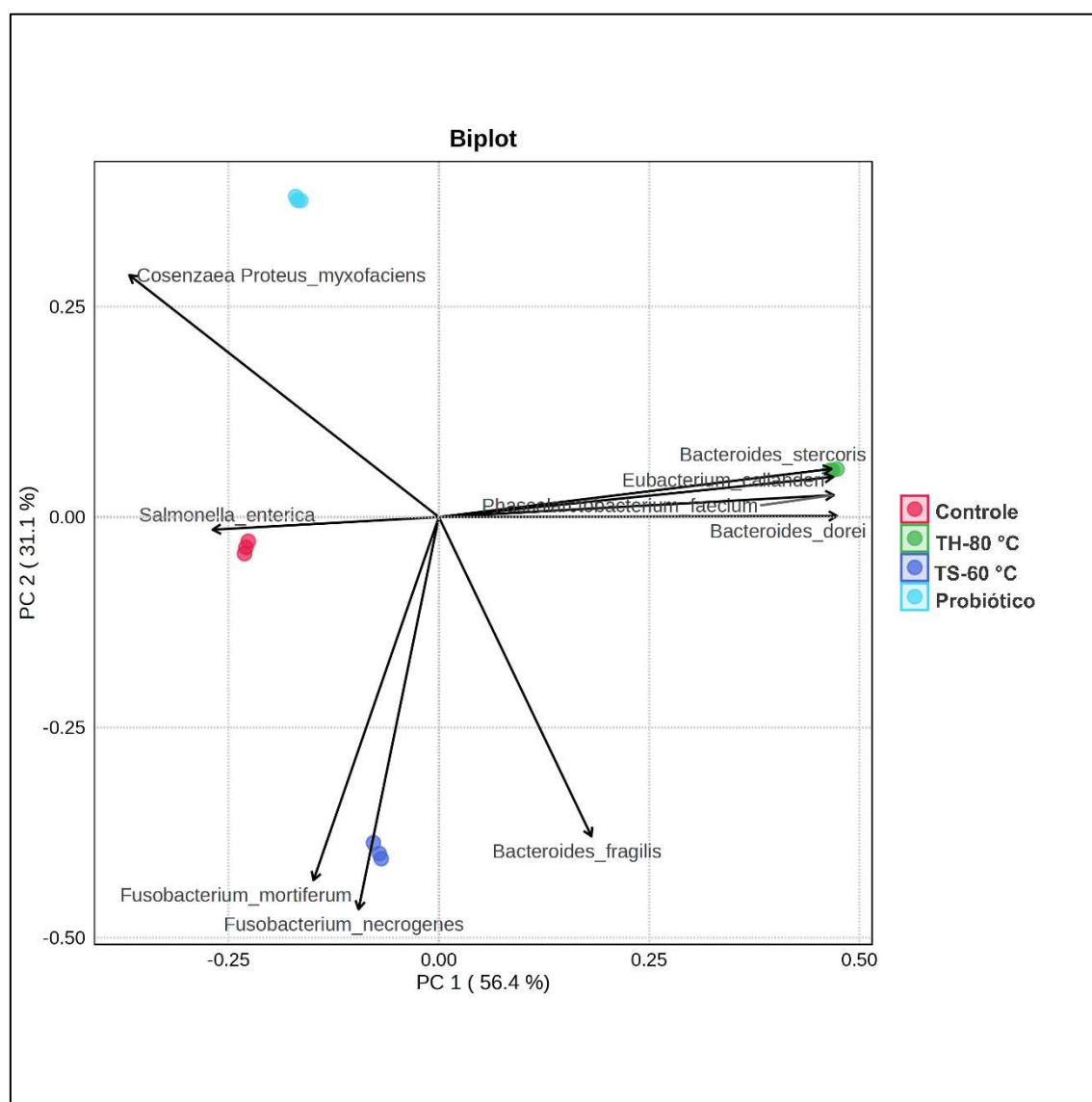


Fonte: Elaborada pelo autor (2026).

A Análise de Componentes Principais (PCA) resumiu a divergência ecológica (Figura 7). As amostras, que compartilhavam um ponto de partida semelhante, formaram agrupamentos (*clusters*) distintos com base nas diferenças das amostras. Os dois primeiros componentes principais (PC1 e PC2) representaram um total combinado de 87,5% da variância total (56,4% e 31,1%, respectivamente). O grupo controle agrupou-se no eixo negativo de PC1, associado ao patógeno *Salmonella enterica*, corroborando a

alta abundância de Proteobactérias. Em contraste, o tratamento TH-80 agrupou-se no eixo positivo de PC1, impulsionado pelo enriquecimento específico de espécies produtoras de AGCCs, como *Eubacterium ruminantium*, *Phascolarctobacterium faecium* e *Bacteroides dorei*. Isso reforça a hipótese de que a matriz processada termicamente funcionou como um substrato de crescimento seletivo para esses comensais intestinais.

Figura 7 – *Biplot* da Análise de Componentes Principais (PCA) ilustrando a variação na composição bacteriana entre os grupos experimentais.



Fonte: Elaborada pelo autor (2026).

As amostras TS-60 agruparam-se separadamente na direção negativa de PC2, impulsionadas por sua associação com *Fusobacterium mortiferum* e *Fusobacterium necrogenes*, sugerindo que o aumento de táxons oportunistas foi um resultado da

composição química específica do substrato TS-60. O suco probiótico formou o seu próprio agrupamento distinto na direção positiva de PC2, definido por sua associação com os gêneros *Cosenzaea* e *Proteus myxofaciens* (anaeróbios facultativos), destacando sua incapacidade de suprimir o aumento das Proteobactérias.

A coocorrência de *Phascolarctobacterium faecium*, *Bacteroides dorei*, *Bacteroides stercoris* e *Eubacterium callanderi* no agrupamento TH-80 valida, de forma mecanística, a hipótese anterior da sintrofia movida a succinato. Estas espécies estão emergindo como potenciais probióticos de próxima geração (PPGs) (Harakeh *et al.*, 2024; Jan *et al.*, 2024) devido aos seus papéis complementares: o *Bacteroides* atua como o principal produtor de succinato (Cheng *et al.*, 2022), alimentando o *Phascolarctobacterium*, enquanto o *Eubacterium* provavelmente serve como um poço metabólico para acetato e lactato visando maximizar a produção de butirato (Singh *et al.*, 2023; Wu *et al.*, 2017). Essa sinergia funcional previne a expansão de patobiontes (Ducarmon *et al.*, 2019) e exemplifica a modulação de precisão alcançada pelo tratamento térmico.

Foi demonstrado que os pós-bióticos modulam positivamente a microbiota intestinal através da entrega direta de compostos bioativos e do exercício de funções semelhantes às dos prebióticos. Esse duplo mecanismo lhes permite induzir efeitos fisiológicos rápidos, contornando o tempo de colonização exigido por probióticos vivos (İncili *et al.*, 2022; Peluzio *et al.*, 2021; Vamanu; Dinu, 2025). Isso se alinha com as observações de Xiao *et al.* (2024), os quais revelaram que a administração de pós-bióticos específicos derivados de *Lacticaseibacillus paracasei* SNB promoveu uma reconfiguração favorável do ecossistema intestinal. O estudo demonstrou um aumento significativo na abundância de gêneros benéficos, como *Bacteroides* e *Bifidobacterium*, concomitante com a supressão de grupos indesejáveis, como *Escherichia-Shigella*, culminando em uma atividade metabólica aprimorada através da produção elevada de ácidos graxos de cadeia curta (AGCCs).

É imperativo reconhecer uma limitação metodológica inerente ao perfilamento taxonômico realizado neste estudo. A região hipervariável V4 do gene rRNA 16S, embora amplamente validada para análises ecológicas globais do microbioma, carece de resolução genética suficiente para distinções definitivas em nível de espécie, particularmente dentro de clados filogeneticamente próximos, como a família *Enterobacteriaceae*. Consequentemente, embora o *pipeline* de classificação tenha atribuído sequências a espécies específicas de forma algorítmica, essas identificações são

tratadas neste estudo de forma presuntiva.

Os dados de diversidade alfa (Tabela 4) fornecem o contexto final para essa segregação. A diversidade alfa foi caracterizada usando métricas complementares: o estimador Chao1 foi empregado para mensurar a riqueza de espécies, sendo particularmente sensível a táxons raros, enquanto os índices de Shannon e Simpson Inverso foram utilizados para avaliar a estrutura da comunidade. Estas duas últimas métricas incorporam dados de abundância relativa, refletindo, assim, tanto a riqueza quanto a uniformidade do consórcio microbiano (Kim *et al.*, 2017).

Tabela 4 – Variações nos índices Chao 1, Shannon e Simpson Inverso na microbiota fecal após a fermentação colônica de cada suco de acerola funcional digerido.

Índices da amostra fecal	TS-60	TH-80	PRO	Controle
Chao1	1211±70 ^d	1647±79 ^c	1906±79 ^b	2126±83 ^a
Shannon	1,90 ±0,48 ^a	2,21±0,26 ^a	2,29±0,19 ^a	2,35±0,1 ^a
Simpson Inverso	4,09±1,77 ^a	4,98±1,64 ^a	5,01±1,16 ^a	5,01±0,1 ^a

Nota: Letras diferentes na mesma linha indicam diferenças estatisticamente significativas ($p < 0,05$) pelo teste de Tukey.

Fonte: Elaborada pelo autor (2026).

Curiosamente, o grupo controle exibiu a maior riqueza comunitária, apesar de estar associado a uma disbiose severa (Tabela 4). Este achado contraintuitivo se alinha com o "princípio de Anna Karenina" e a visões recentes sobre a estocasticidade da microbiota, sugerindo um estado ecológico não funcional e instável caracterizado pelo acúmulo oportunista de patobiontes transitórios devido à perda de exclusão competitiva (Shi *et al.*, 2024; Zaneveld *et al.*, 2017). Em contrapartida, todas as amostras processadas pareceram reduzir a riqueza geral da comunidade (Tabela 4). O tratamento TH-80 pareceu atingir um equilíbrio ideal, reduzindo a riqueza especificamente por meio da redução de patógenos, enquanto promoveu um consórcio seletivo e metabolicamente superior através de exclusão competitiva e modulação direcionada (Cardoso *et al.*, 2025; Sahoo *et al.*, 2025).

Embora o modelo *in vitro* aqui empregado minimize a variabilidade do hospedeiro, permitindo uma comparação precisa dos efeitos da matriz, ele carece da interface imunológica mucosa e da dinâmica de absorção de um hospedeiro vivo. Portanto, o potencial inflamatório do TS-60 aqui observado, conforme evidenciado pela expansão do gênero *Fusobacterium*, indica que modelos *in vivo* complementares ainda são necessários após os modelos *in vitro*. No entanto, a partir de uma perspectiva industrial, esses achados são altamente promissores. Além das vantagens biológicas demonstradas, o processamento térmico (80 °C) é uma operação unitária padrão e escalável na indústria de sucos. Isso poderia facilitar a tradução comercial desta bebida potencialmente pós-biótica, oferecendo um duplo benefício de superioridade funcional e viabilidade industrial.

5.4 Conclusão

Este estudo demonstrou que, para uma determinada matriz alimentar, a escolha da tecnologia de inativação é um importante determinante da funcionalidade e da segurança do pós-biótico, atuando como uma ferramenta para a modulação da microbiota intestinal. O processamento térmico (80 °C) mostrou-se uma estratégia otimizada para o suco de acerola fermentado por *Lactocaseibacillus casei*. Essa matriz termicamente modificada sustentou uma sintrofia benéfica impulsionada pelo succinato (envolvendo *Bacteroides* e *Phascolarctobacterium*, fortes candidatos a probióticos de próxima geração — PPGs), enquanto suprimiu simultaneamente as *Proteobacteria* disbióticas em um modelo *in vitro*. As assinaturas funcionais direcionadas sugerem que a desnaturação e a permeabilização térmicas favoreceram vias sacarolíticas de alimentação cruzada (*cross-feeding*) que maximizaram a produção de butirato. Por outro lado, a termossonicação (aplicada como uma tecnologia híbrida emergente a 60 °C) levou à expansão do gênero oportunista *Fusobacterium*, sugerindo um risco potencial de disbiose proteolítica em contextos de absorção intestinal prejudicada. Consequentemente, desafiando a premissa predominante de que as tecnologias emergentes invariavelmente superam o aquecimento convencional, o tratamento térmico direcionado representa uma ferramenta de engenharia de matriz importante e altamente escalável para o desenvolvimento de ingredientes pós-bióticos butirogênicos e seguros. Estudos futuros devem se concentrar na utilização de modelos de digestão dinâmica e ensaios *in vivo* para validar os efeitos fisiológicos de proteção ao hospedeiro derivados desse perfil ecológico com alto rendimento de butirato.

6 CONCLUSÃO GERAL

Esta tese demonstrou a viabilidade tecnológica e funcional da produção de bebidas pós-bióticas não lácteas a partir de matrizes de frutas (acerola e laranja) fermentadas por *Lactocaseibacillus casei* NRRL B-442. A pesquisa evidenciou que as tecnologias de inativação transcendem o papel de conservação, atuando como ferramentas decisivas de engenharia de matriz que determinam a cinética do processo, a qualidade físico-química e a eficácia biológica do produto final.

Na etapa de desenvolvimento, tanto a termossonicação (TS) quanto o processamento térmico (TH) inativaram efetivamente a cepa probiótica, permitindo a obtenção de bebidas seguras, com alta retenção de compostos bioativos e atividade antibacteriana estável contra patógenos de origem alimentar ao longo do armazenamento refrigerado. Embora a termossonicação tenha apresentado uma preservação superior de compostos sensíveis, como o ácido ascórbico, a sua eficiência de inativação revelou-se estritamente dependente da geometria do reator e das propriedades acústicas do material.

A modelagem matemática comprovou que, enquanto o processamento térmico segue consistentemente uma cinética linear previsível, a inativação termossonica em reatores confinados de aço resulta em um efeito de cauda resistente, impulsionado pela formação de ondas estacionárias. Contudo, a otimização do *design* do reator para garantir uma corrente acústica vigorosa elimina essas subpopulações e reduz o tempo de processamento em até 57% quando comparado à pasteurização térmica, consolidando a TS como uma alternativa cinética e energeticamente superior.

Apesar das vantagens de processo da termossonicação, a avaliação da assinatura ecológica *in vitro* revelou que os métodos de inativação reestruturam a matriz alimentar de maneiras que impactam divergentemente a microbiota intestinal humana. O processamento térmico a 80 °C provou ser a estratégia funcional mais segura e eficaz, gerando um pós-biótico butirogênico que suprimiu *Proteobacteria* disbióticas e promoveu uma sintrofia impulsionada por succinato, enriquecendo probióticos de próxima geração (especificamente os gêneros *Phascolarctobacterium* e *Bacteroides*). Em contrapartida, a cavitação acústica gerada pela termossonicação a 60 °C aumentou a bioacessibilidade de peptídeos intracelulares, o que inadvertidamente favoreceu a expansão do gênero pró-inflamatório *Fusobacterium* no modelo colônico estudado.

Em suma, a tese conclui que a engenharia de reatores é indispensável para o sucesso industrial da termossonicação, mas é o processamento térmico convencional que se destaca como a estratégia de modificação de matriz mais robusta para a produção de pós-bióticos. O calor não apenas garante a inativação segura, mas fomenta a formação de complexos estruturais e a liberação de polímeros que alimentam redes benéficas de *cross-feeding* no intestino, consolidando as matrizes de frutas processadas termicamente como promissoras intervenções para a saúde intestinal.

REFERÊNCIAS

- ABDULSTAR, A. R.; ALTEMIMI, A. B.; AL-HILPHY, A. R. Exploring the power of thermosonication: A comprehensive review of its applications and impact in the food industry. **Foods**, [s. l.], v. 12, n. 7, p. 1459, 2023. DOI: <https://doi.org/10.3390/foods12071459>.
- ABEDI, E.; POURMOHAMMADI, K.; MOUSAVIFARD, M.; SAYADI, M. Comparison between surface hydrophobicity of heated and thermosonicated cells to detoxify aflatoxin B1 by co-culture *Lactobacillus plantarum* and *Lactobacillus rhamnosus* in sourdough: Modeling studies. **LWT**, [s. l.], v. 154, p. 112616, 2022. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2021.112616>.
- ADEBAYO-TAYO, B. C.; OLOMITUTU, F. O.; ADEBAMI, G. E. Production and evaluation of probioticated mango juice using *Pediococcus pentosaceus* and *Pediococcus acidilactici* during storage at different temperature. **Journal of Agriculture and Food Research**, [s. l.], v. 6, 2021. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jafr.2021.100202>.
- ADEBO, O. A.; MEDINA-MEZA, I. G. Impact of fermentation on the phenolic compounds and antioxidant activity of whole cereal grains: a mini review. **Molecules**, [s. l.], v. 25, n. 4, p. 927, 2020. DOI: <https://doi.org/10.3390/MOLECULES25040927>.
- AFZAAL, M. *et al.* Human gut microbiota in health and disease: Unveiling the relationship. **Frontiers in Microbiology**, [s. l.], v. 13, p. 999001, 2022. DOI: <https://doi.org/10.3389/fmicb.2022.999001>.
- AGGARWAL, S. *et al.* Postbiotics: From emerging concept to application. **Frontiers in Sustainable Food Systems**, [s. l.], v. 6, p. 887642, 2022. DOI: <https://doi.org/10.3389/fsufs.2022.887642>.
- AGHAJANZADEH, S.; ZIAIIFAR, A. M.; VERKERK, R. Effect of thermal and non-thermal treatments on the color of citrus juice: A review. **Food Reviews International**, [s. l.], v. 39, p. 3555–3577, 2023. DOI: <https://doi.org/10.1080/87559129.2021.2012799>.
- AGUILAR, K. *et al.* Ascorbic acid stability in fruit juices during thermosonication. **Ultrasonics Sonochemistry**, [s. l.], v. 37, p. 375–381, 2017. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ultsonch.2017.01.029>.
- AGUILAR-TOALÁ, J. E. *et al.* Postbiotics: an evolving term within the functional foods field. **Trends in Food Science & Technology**, [s. l.], v. 75, p. 105–114, 2018. DOI: <https://doi.org/10.1016/J.TIFS.2018.03.009>.
- AKARACHANTACHOTE, N.; CHADCHAM, S.; SAITHANU, K. Cutoff threshold of variable importance in projection for variable selection. **International Journal of Pure and Applied Mathematics**, [s. l.], v. 94, n. 3, p. 307-322, 2014. DOI: <https://doi.org/10.12732/ijpam.v94i3.2>.

AKHAVAN, F. *et al.* Postbiotics: Production to consumption as natural enhancers and preservatives in the food industry. **Food Bioscience**, [s. l.], v. 80, p. 108865, 2026. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.fbio.2026.108865>.

ALCÁNTARA-ZAVALA, A. E. *et al.* Thermosonication as an alternative method for processing, extending the shelf life, and conserving the quality of *pulque*: A non-dairy Mexican fermented beverage. **Ultrasonics Sonochemistry**, [s. l.], v. 70, p. 105290, 2021. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ultsonch.2020.105290>.

ALGBOORY, H. L.; MUHIALDIN, B. J. Novel peptides contribute to the antimicrobial activity of camel milk fermented with *Lactobacillus plantarum* IS10. **Food Control**, [s. l.], v. 126, 2021. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2021.108057>.

ALI, U. *et al.* Stability and survivability of alginate gum-coated *Lactobacillus rhamnosus* GG in simulated gastrointestinal conditions and probiotic juice development. **Journal of Food Quality**, [s. l.], v. 2023, n. 1, p. 3660968, 2023. DOI: <https://doi.org/10.1155/2023/3660968>.

ALMADA, C. N. *et al.* Obtaining paraprobiotics from *Lactobacillus acidophilus*, *Lactocaseibacillus casei* and *Bifidobacterium animalis* using six inactivation methods: Impacts on the cultivability, integrity, physiology, and morphology. **Journal of Functional Foods**, [s. l.], v. 87, p. 104826, 2021. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jff.2021.104826>.

ALTAY, R.; SADAGHIANI, A. K.; SEVGİN, İ. M.; ŞİŞMAN, A.; KOŞAR, A. Numerical and experimental studies on the effect of surface roughness and ultrasonic frequency on bubble dynamics in acoustic cavitation. **Energies**, [s. l.], v. 13, n. 5, p. 1126, 2020. DOI: <https://doi.org/10.3390/en13051126>.

ANAYA-ESPARZA, L. M. *et al.* Thermosonication: an alternative processing for fruit and vegetable juices. **Trends in Food Science and Technology**, [s. l.], v. 61, p. 26–37, 2017. DOI: <https://doi.org/10.1016/J.TIFS.2016.11.020>.

ARMET, A. M. *et al.* Rethinking healthy eating in light of the gut microbiome. **Cell Host & Microbe**, [s. l.], v. 30, n. 6, p. 764–785, 2022. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.chom.2022.04.016>.

ASPRIDOU, Z.; KOUTSOUMANIS, K. P. Individual cell heterogeneity as variability source in population dynamics of microbial inactivation. **Food Microbiology**, [s. l.], v. 45, p. 216–221, 2015. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.fm.2014.04.008>.

BARBOSA, A. A. T.; MANTOVANI, H. C.; JAIN, S. Bacteriocins from lactic acid bacteria and their potential in the preservation of fruit products. **Critical Reviews in Biotechnology**, [s. l.], v. 37, n. 7, p. 852–864, 2017. DOI: <https://doi.org/10.1080/07388551.2016.1262323>.

BARROS, C. P. *et al.* Paraprobiotics and postbiotics: concepts and potential applications in dairy products. **Current Opinion in Food Science**, [s. l.], v. 32, p. 1–8, 2020. DOI: <https://doi.org/10.1016/J.COFS.2019.12.003>.

- BEEGUM, F.; CHANDRAN, A. Postbiotics: A developing notion to application. **International Journal of Advanced Biochemistry Research**, [s. l.], v. 8, p. 148–153, 2024. DOI: <https://doi.org/10.33545/26174693.2024.v8.i9sb.2076>.
- BELWAL, T. *et al.* Phytopharmacology of Acerola (*Malpighia spp.*) and its potential as functional food. **Trends in Food Science & Technology**, [s. l.], v. 74, p. 99–106, 2018. DOI: <https://doi.org/10.1016/J.TIFS.2018.01.014>.
- BERMUDEZ-AGUIRRE, D.; NIEMIRA, B. A. Pasteurization of foods with ultrasound: The present and the future. **Applied Sciences**, [s. l.], v. 12, p. 10416, 2022. DOI: <https://doi.org/10.3390/app122010416>.
- BHARGAVA, N.; MOR, R. S.; KUMAR, K.; SHARANAGAT, V. S. Advances in application of ultrasound in food processing: A review. **Ultrasonics Sonochemistry**, [s. l.], v. 70, p. 105293, 2021. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ultsonch.2020.105293>.
- BIGELOW, W. D. The logarithmic nature of thermal death time curves. **The Journal of Infectious Diseases**, [s. l.], v. 29, n. 5, p. 528–536, 1921. DOI: <https://doi.org/10.1093/infdis/29.5.528>.
- BOYTE, M. E. *et al.* A review of probiotic ingredient safety supporting monograph development conducted by the United States Pharmacopeia (USP). **Journal of Dietary Supplements**, [s. l.], v. 22, n. 1, p. 123–161, 2025. DOI: <https://doi.org/10.1080/19390211.2024.2314488>.
- BRANDÃO, L. R. *et al.* Live and ultrasound-inactivated: *Lactocaseibacillus casei* modulate the intestinal microbiota and improve biochemical and cardiovascular parameters in male rats fed a high-fat diet. **Food & Function**, [s. l.], v. 12, n. 12, p. 5287–5300, 2021. DOI: <https://doi.org/10.1039/d1fo01064f>.
- BRENNAN, C. A.; GARRETT, W. S. *Fusobacterium nucleatum* — symbiont, opportunist and *oncobacterium*. **Nature Reviews Microbiology**, [s. l.], v. 17, n. 3, p. 156–166, 2019. DOI: <https://doi.org/10.1038/s41579-018-0129-6>.
- BRENNEN, C. E. Cavitation and bubble dynamics. [s. l.]: **Oxford University Press**, 1995. DOI: <https://doi.org/10.1017/CBO9781107338760>.
- BRODKORB, A. *et al.* INFOGEST static *in vitro* simulation of gastrointestinal food digestion. **Nature Protocols**, [s. l.], v. 14, n. 4, p. 991–1014, 2019. DOI: <https://doi.org/10.1038/s41596-018-0119-1>.
- BUENO, E. B. T. *et al.* Postbiotics derived from lactic acid bacteria fermentation: therapeutic potential in the treatment of muscular complications in inflammatory bowel disease. **Fermentation**, [s. l.], v. 11, n. 7, p. 362, 2025. DOI: <https://doi.org/10.3390/FERMENTATION11070362>.
- BYNDLOSS, M. X. *et al.* Microbiota-activated PPAR- γ signaling inhibits dysbiotic *Enterobacteriaceae* expansion. **Science**, [s. l.], v. 357, n. 6351, p. 570–575, 2017. DOI: <https://doi.org/10.1126/science.aam9949>.

CARDOSO, A. J. R. *et al.* Postbiotics: Modulation of the gut microbiota and potential for association with nanotechnology. **Probiotics and Antimicrobial Proteins**, [s. l.], 2025. DOI: <https://doi.org/10.1007/s12602-025-10675-3>.

CEBRIÁN, G.; CONDÓN, S.; MAÑAS, P. Physiology of the inactivation of vegetative bacteria by thermal treatments: mode of action, influence of environmental factors and inactivation kinetics. **Foods**, [s. l.], v. 6, n. 12, p. 107, 2017. DOI: <https://doi.org/10.3390/foods6120107>.

CHACHA, J. S. *et al.* Revisiting non-thermal food processing and preservation methods—action mechanisms, pros and cons: a technological update (2016–2021). **Foods**, [s. l.], v. 10, n. 6, 2021. DOI: <https://doi.org/10.3390/foods10061430>.

CHAKRABORTY, S.; DEKA, G.; DUTTA, H. Effect of particle size, probe type, position and glassware geometry on laboratory-scale ultrasonic extraction of *Citrus maxima* flavedo. **Food Physics**, [s. l.], v. 2, p. 100040, 2024. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.foodp.2024.100040>.

CHEN, L. *et al.* Numerical modelling of effects of ultrasound-induced acoustic streaming on hydrodynamics in a confined impinging jet reactor using a non-linear model based on local velocity fluctuation. **Chemical Engineering and Processing - Process Intensification**, [s. l.], v. 183, p. 109253, 2023. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.cep.2022.109253>.

CHENG, J. *et al.* *Bacteroides* utilization for dietary polysaccharides and their beneficial effects on gut health. **Food Science and Human Wellness**, [s. l.], v. 11, n. 5, p. 1101–1110, 2022. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.fshw.2022.04.002>.

CUEVAS-GONZÁLEZ, P. F.; LICEAGA, A. M.; AGUILAR-TOALÁ, J. E. Postbiotics and paraprobiotics: from concepts to applications. **Food Research International**, [s. l.], v. 136, 2020. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2020.109502>.

CUI, Y.; QU, X. Genetic mechanisms of prebiotic carbohydrate metabolism in lactic acid bacteria: Emphasis on *Lactocaseibacillus casei* and *Lactocaseibacillus paracasei* as flexible, diverse and outstanding prebiotic carbohydrate starters. **Trends in Food Science & Technology**, [s. l.], v. 115, p. 486–499, 2021. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2021.06.058>.

D'AMICO, A.; BUZZANCA, C.; PISTORIO, E.; MELILLI, M. G.; DI STEFANO, V. Fruit juices as alternative to dairy products for probiotics' intake. **Beverages**, [s. l.], v. 10, n. 4, 2024. DOI: <https://doi.org/10.3390/BEVERAGES10040100>.

DARBANDI, A. *et al.* Bacteriocins: properties and potential use as antimicrobials. **Journal of Clinical Laboratory Analysis**, [s. l.], v. 36, n. 1, 2022. DOI: <https://doi.org/10.1002/jcla.24093>.

DASH, K. K. *et al.* A comprehensive review on heat treatments and related impact on the quality and microbial safety of milk and milk-based products. **Food Chemistry Advances**, [s. l.], v. 1, p. 100041, 2022. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.focha.2022.100041>.

DE ALBUQUERQUE, M. A. C. *et al.* Tropical fruit by-products water extracts as sources of soluble fibres and phenolic compounds with potential antioxidant, anti-inflammatory, and functional properties. **Journal of Functional Foods**, [s. l.], v. 52, p. 724–733, 2019. DOI: <https://doi.org/10.1016/J.JFF.2018.12.002>.

DEAK, T.; MOHÁCSI-FARKAS, C. Thermal treatment. **In: Food Safety Management: a practical guide for the food industry**. 2. ed. [s. l.], p. 405–419, 2023. DOI: <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-820013-1.00008-5>.

DIETHER, N. E.; WILLING, B. P. Microbial fermentation of dietary protein: An important factor in diet-microbe-host interaction. **Microorganisms**, [s. l.], v. 7, n. 1, p. 19, 2019. DOI: <https://doi.org/10.3390/microorganisms7010019>.

DIMITROVSKI, D. *et al.* Developing probiotic pumpkin juice by fermentation with commercial probiotic strain *Lactobacillus casei* 431. **Journal of Food Processing and Preservation**, [s. l.], v. 45, n. 3, p. 1–9, 2021. DOI: <https://doi.org/10.1111/jfpp.15245>.

DONG, Z. *et al.* Continuous ultrasonic reactors: design, mechanism and application. **Materials**, [s. l.], v. 13, n. 2, 2020. DOI: <https://doi.org/10.3390/ma13020344>.

DUCARMON, Q. R. *et al.* Gut microbiota and colonization resistance against bacterial enteric infection. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, [s. l.], v. 83, n. 3, 2019. DOI: <https://doi.org/10.1128/mmmbr.00007-19>.

DZANDU, B.; CHOTIKO, A.; SATHIVEL, S. Antioxidant activity and viability of *Lactocaseibacillus rhamnosus*, *Lactocaseibacillus casei*, and co-culture in fermented tomato juice during refrigerated storage. **Food Bioscience**, [s. l.], v. 50, p. 102085, 2022. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.fbio.2022.102085>.

EVELYN; MILANI, E.; SILVA, F. V. M. Comparing high pressure thermal processing and thermosonication with thermal processing for the inactivation of bacteria, moulds, and yeasts spores in foods. **Journal of Food Engineering**, [s. l.], v. 214, p. 90–96, 2017. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2017.06.027>.

EVELYN; SILVA, F. V. M. High pressure processing pretreatment enhanced the thermosonication inactivation of *Alicyclobacillus acidoterrestris* spores in orange juice. **Food Control**, [s. l.], v. 62, p. 365–372, 2016. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2015.11.007>.

EVELYN; SILVA, F. V. M. Thermosonication versus thermal processing of skim milk and beef slurry: modeling the inactivation kinetics of psychrotrophic *Bacillus cereus* spores. **Food Research International**, [s. l.], v. 67, p. 67–74, 2015. DOI: <https://doi.org/10.1016/J.FOODRES.2014.10.028>.

EZZINE, C. *et al.* Fatty acids produced by the gut microbiota dampen host inflammatory responses by modulating intestinal SUMOylation. **Gut Microbes**, [s. l.], v. 14, n. 1, p. 2108280, 2022. DOI: <https://doi.org/10.1080/19490976.2022.2108280>.

FAN, K.; WU, J.; CHEN, L. Ultrasound and its combined application in the

improvement of microbial and physicochemical quality of fruits and vegetables: a review. **Ultrasonics Sonochemistry**, [s. l.], v. 80, n. 2, p. 105838, 2021. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ultsonch.2021.105838>.

FAN, L. *et al.* Comparison of high- and low-frequency thermosonication and carvacrol treatments of carrot juice: microbial inactivation and quality retention. **Applied Food Research**, [s. l.], v. 2, n. 2, 2022. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.afres.2022.100162>.

FANG, H. *et al.* Postbiotic impact on host metabolism and immunity provides therapeutic potential in metabolic disease. **Endocrine Reviews**, [s. l.], v. 45, n. 4, p. 539–561, 2024. DOI: <https://doi.org/10.1210/endrev/bnae025>.

FENG, M. *et al.* Effect of Multi-Mode Thermosonication on the Microbial Inhibition and Quality Retention of Strawberry Clear Juice during Storage at Varied Temperatures. **Foods**, [s. l.], v. 11, n. 17, p. 2593, 2022. DOI: <https://doi.org/10.3390/FOODS11172593>.

FENG, X. *et al.* Comparison of high hydrostatic pressure, ultrasound, and heat treatments on the quality of strawberry–apple–lemon juice blend. **Foods**, [s. l.], v. 9, n. 2, 2020. DOI: <https://doi.org/10.3390/foods9020218>.

FERNANDES, A. S.; FERREIRA-PÊGO, C.; COSTA, J. G. Functional foods for health: the antioxidant and anti-inflammatory role of fruits, vegetables and culinary herbs. **Foods**, [s. l.], v. 12, 2023. DOI: <https://doi.org/10.3390/foods12142742>.

FERNANDES, F. A. N.; RODRIGUES, S. Cold plasma processing on fruits and fruit juices: a review on the effects of plasma on nutritional quality. **Processes**, [s. l.], v. 9, n. 12, 2021. DOI: <https://doi.org/10.3390/pr9122098>.

FILHO, A. L. DOS *et al.* Production and stability of probiotic cocoa juice with sucralose as sugar substitute during refrigerated storage. **LWT**, [s. l.], v. 99, p. 371–378, 2019. DOI: <https://doi.org/10.1016/J.LWT.2018.10.007>.

FILHO, E. *et al.* Chemometric evaluation of the volatile profile of probiotic melon and probiotic cashew juice. **Food Research International**, [s. l.], v. 99, p. 461–468, 2017. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2017.05.030>.

FONTELES, T. V. *et al.* Metabolic responses of kombucha consortium fermentation upon ultrasound-processing. **Food Chemistry Advances**, [s. l.], v. 4, p. 100646, 2024. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.focha.2024.100646>.

FONTELES, T. V. *et al.* Stability and quality parameters of probiotic cantaloupe melon juice produced with sonicated juice. **Food and Bioprocess Technology**, [s. l.], v. 6, n. 10, p. 2860–2869, 2013. DOI: <https://doi.org/10.1007/s11947-012-0962-y>.

FUSCO, W. *et al.* Short-chain fatty-acid-producing bacteria: Key components of the human gut microbiota. **Nutrients**, [s. l.], v. 15, n. 9, p. 2211, 2023. DOI: <https://doi.org/10.3390/nu15092211>.

GARG, S. *et al.* Multifunctional postbiotics for clean-label foods: A review of

sustainable production, industrial applications, and regulatory aspects. **Food Bioscience**, [s. l.], v. 80, p. 108972, 2026. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.fbio.2026.108972>.

GARROTE ACHOU, C.; CANTALEJO DÍEZ, M. J.; DIAZ CANO, J.; MOLINOS EQUIZA, X. Evaluation of different nutritional sources in lactic acid bacteria fermentation for sustainable postbiotic production. **Foods**, [s. l.], v. 14, n. 4, p. 649, 2025. DOI: <https://doi.org/10.3390/foods14040649>.

GAZDA, P.; GLIBOWSKI, P. Advanced technologies in food processing—development perspective. **Applied Sciences**, [s. l.], v. 14, n. 9, 2024. DOI: <https://doi.org/10.3390/app14093617>.

GOGATE, P. R. *et al.* Cavitation reactors: efficiency assessment using a model reaction. **AIChE Journal**, [s. l.], v. 47, n. 11, p. 2526–2538, 2001. DOI: <https://doi.org/10.1002/AIC.690471115>.

GOGATE, P. R.; PANDIT, A. B. Sonochemical reactors: scale up aspects. **Ultrasonics Sonochemistry**, [s. l.], v. 11, n. 3–4, p. 105–117, 2004. DOI: <https://doi.org/10.1016/J.ULTSONCH.2004.01.005>.

GUO, J. *et al.* Effects of *Lactobacillus paracasei* JY062 postbiotic on intestinal barrier, immunity, and gut microbiota. **Nutrients**, [s. l.], v. 17, n. 7, p. 1272, 2025. DOI: <https://doi.org/10.3390/NU17071272/S1>.

HABIBI, P. *et al.* Effect of heat stress on DNA damage: A systematic literature review. **International Journal of Biometeorology**, [s. l.], v. 66, n. 11, p. 2147–2158, 2022. DOI: <https://doi.org/10.1007/s00484-022-02351-w>.

HAJAR-AZHARI, S. *et al.* Lacto-fermented garlic sauce improved the quality and extended the shelf life of lamb meat under the chilled condition. **International Journal of Food Microbiology**, [s. l.], v. 395, p. 110190, 2023. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2023.110190>.

HARAKEH, S. *et al.* Next-generation probiotics: Promising therapeutic candidates for metabolic and gastrointestinal disorders. **Indian Journal of Pharmaceutical Sciences**, [s. l.], v. 86, n. 6, p. 1922–1934, 2024. DOI: <https://doi.org/10.36468/pharmaceutical-sciences.1460>.

HASHEMI, S. M. B. *et al.* Thermodynamics, kinetics, and computational fluid dynamics modeling of *Escherichia coli* and *Salmonella Typhi* inactivation during the thermosonication process of celery juice. **Ultrasonics Sonochemistry**, [s. l.], v. 104, p. 106820, 2024. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ultsonch.2024.106820>.

HASHEMI, S. M. B. *et al.* Ultrasound-assisted lactic acid fermentation of Bakraei (*Citrus reticulata* cv. *Bakraei*) juice: physicochemical and bioactive properties. **Fermentation**, [s. l.], v. 9, n. 1, p. 37, 2023. DOI: <https://doi.org/10.3390/fermentation9010037>.

HASSAN, A. B. *et al.* Effect of natural fermentation on the chemical composition,

mineral content, phytochemical compounds, and antioxidant activity of *Ziziphus spinachristi* (L.) “nabag” seeds. **Processes**, [s. l.], v. 9, n. 7, 2021. DOI: <https://doi.org/10.3390/pr9071228>.

HE, J. F. *et al.* LHH1, a novel antimicrobial peptide with anti-cancer cell activity identified from *Lactobacillus casei* HZ1. **AMB Express**, [s. l.], v. 10, n. 1, 2020. DOI: <https://doi.org/10.1186/s13568-020-01139-8>.

HERIGSTAD, B.; HAMILTON, M.; HEERSINK, J. How to optimize the drop plate method for enumerating bacteria. **Journal of Microbiological Methods**, [s. l.], v. 44, n. 2, p. 121–129, 2001. DOI: [https://doi.org/10.1016/S0167-7012\(00\)00241-4](https://doi.org/10.1016/S0167-7012(00)00241-4).

HOLDSWORTH, S. D.; SIMPSON, R. Thermal Processing of Packaged. **Foods 3. ed.** [S.l.]: Springer, 2016. DOI: <https://doi.org/10.1007/978-3-319-24904-9>.

HOMAYOUNI RAD, A. *et al.* Postbiotics: A novel strategy in food allergy treatment. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, [s. l.], v. 61, n. 3, p. 492–499, 2020. DOI: <https://doi.org/10.1080/10408398.2020.1738333>.

IKEYAMA, N. *et al.* Microbial interaction between the succinate-utilizing bacterium *Phascolarctobacterium faecium* and the gut commensal *Bacteroides thetaiotaomicron*. **MicrobiologyOpen**, [s. l.], v. 9, n. 10, 2020. DOI: <https://doi.org/10.1002/mbo3.1111>.

INCILI, G. K. *et al.* Characterization of lactic acid bacteria postbiotics, evaluation *in-vitro* antibacterial effect, microbial and chemical quality on chicken drumsticks. **Food Microbiology**, [s. l.], v. 104, p. 104001, 2022. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.fm.2022.104001>.

JADHAV, H. B.; CHOUDHARY, P. Emerging techniques for the processing of food to ensure higher food safety with enhanced food quality: a review. **Discover Food**, [s. l.], v. 4, 2024. DOI: <https://doi.org/10.1007/s44187-024-00089-5>.

JAFARPOUR, D. The effect of heat treatment and thermosonication on the microbial and quality properties of green olive. **Journal of Food Measurement and Characterization**, [s. l.], v. 16, n. 3, p. 2172–2180, 2022. DOI: <https://doi.org/10.1007/s11694-022-01322-4>.

JAKOBEK, L. Interactions of polyphenols with carbohydrates, lipids and proteins. **Food Chemistry**, [s. l.], v. 175, p. 556–567, 2015. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2014.12.013>.

JAN, T. *et al.* Next generation probiotics for human health: An emerging perspective. **Heliyon**, [s. l.], v. 10, n. 16, p. e35980, 2024. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2024.e35980>.

JANSSEUNE, S. C. G. *et al.* The heat treatment of a *lactobacilli* probiotic to derive a postbiotic has minor effects on the metabolomic profile. **Fermentation**, [s. l.], v. 11, n. 2, p. 87, 2025. DOI: <https://doi.org/10.3390/fermentation11020087>.

JIA, X. *et al.* Citrus juice off-flavor during different processing and storage: review of

odorants, formation pathways, and analytical techniques. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, [s. l.], v. 64, n. 10, p. 3018–3043, 2024. DOI: <https://doi.org/10.1080/10408398.2022.2129581>.

JIANG, M. *et al.* Mechanisms of microbiota-gut-brain axis communication in anxiety disorders. **Frontiers in Neuroscience**, [s. l.], v. 18, p. 1501134, 2024. DOI: <https://doi.org/10.3389/FNINS.2024.1501134>.

KALKAN, A. E. *et al.* Beyond the gut: unveiling butyrate's global health impact through gut health and dysbiosis-related conditions: a narrative review. **Nutrients**, [s. l.], v. 17, n. 8, p. 1305, 2025. DOI: <https://doi.org/10.3390/NU17081305>.

KARDOONI, Z. *et al.* Probiotic viability, physicochemical, and sensory properties of probiotic orange juice. **Journal of Food Measurement and Characterization**, [s. l.], v. 17, n. 2, p. 1817–1822, 2023. DOI: <https://doi.org/10.1007/s11694-022-01771-x>.

KERNOU, O. *et al.* Impact of thermal and non-thermal pasteurization on the microbial inactivation of fruit juice: review. **Journal of Applied Pharmacy**, [s. l.], v. 15, 2023. DOI: <https://doi.org/10.35248/2476-2059.23.8.198>.

KEWALRAMANI, J. A. *et al.* Contributions of reactor geometry and ultrasound frequency on the efficiency of sonochemical reactor. **Ultrasonics Sonochemistry**, [s. l.], v. 98, p. 106529, 2023. DOI: <https://doi.org/10.1016/J.ULTSONCH.2023.106529>.

KIM, B. R. *et al.* Deciphering diversity indices for a better understanding of microbial communities. **Journal of Microbiology and Biotechnology**, [s. l.], v. 27, n. 12, p. 2089-2093, 2017. DOI: <https://doi.org/10.4014/jmb.1709.09027>.

KIM, S. J. *et al.* Anti-tumor effects of heat-killed *Lactobacillus reuteri* MG5346 and *Lactocaseibacillus casei* MG4584 against human colorectal carcinoma through Caspase-9-dependent apoptosis in xenograft model. **Microorganisms**, [s. l.], v. 10, n. 3, p. 533, 2022. DOI: <https://doi.org/10.3390/microorganisms10030533>.

KWAW, E. *et al.* Impact of ultrasonication and pulsed light treatments on phenolics concentration and antioxidant activities of lactic-acid-fermented mulberry juice. **LWT**, [s. l.], v. 92, p. 61–66, 2018. DOI: <https://doi.org/10.1016/J.LWT.2018.02.016>.

LANGFELD, L. Q. *et al.* A review of the antimicrobial and immune-modulatory properties of the gut microbiota-derived short chain fatty acid propionate - What is new? **European Journal of Microbiology and Immunology**, [s. l.], v. 11, n. 2, p. 50-56, 2021. DOI: <https://doi.org/10.1556/1886.2021.00005>.

LAURINDO, L. F. *et al.* Health benefits of acerola (*Malpighia spp.*) and its by-products: a comprehensive review of nutrient-rich composition, pharmacological potential, and industrial applications. **In: Food Bioscience**. [s. l.]: Elsevier Ltd., v. 62, 2024. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.fbio.2024.105422>.

LAUTERI, C. *et al.* Ultrasound technology as inactivation method for foodborne pathogens: A review. **Foods**, [s. l.], v. 12, n. 6, p. 1212, 2023. DOI: <https://doi.org/10.3390/foods12061212>.

LEISTNER, L. Basic aspects of food preservation by hurdle technology. **International Journal of Food Microbiology**, [s. l.], v. 55, n. 1-3, p. 181–186, 2000. DOI: [https://doi.org/10.1016/S0168-1605\(00\)00161-6](https://doi.org/10.1016/S0168-1605(00)00161-6).

LEONARD, W. *et al.* Fermentation transforms the phenolic profiles and bioactivities of plant-based foods. **Biotechnology Advances**, [s. l.], v. 49, p. 107763, 2021. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2021.107763>.

LEONARD, W. *et al.* Fruit juices as a carrier of probiotics to modulate gut phenolics and microbiota. **Food & Function**, [s. l.], v. 13, n. 19, p. 10333–10346, 2022. DOI: <https://doi.org/10.1039/D2FO01851A>.

LI, P. *et al.* Pectic oligosaccharides hydrolyzed from orange peel by fungal multi-enzyme complexes and their prebiotic and antibacterial potentials. **LWT - Food Science and Technology**, [s. l.], v. 69, p. 203–210, 2016. DOI: <https://doi.org/10.1016/J.LWT.2016.01.042>.

LI, X. *et al.* The impact of ultrasonic treatment on blueberry wine anthocyanin color and its *in-vitro* anti-oxidant capacity. **Food Chemistry**, [s. l.], v. 333, 2020. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2020.127455>.

LIANG, Q. *et al.* Current challenges and development strategies of bacteriocins produced by lactic acid bacteria applied in the food industry. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, [s. l.], v. 24, n. 1, 2025. DOI: <https://doi.org/10.1111/1541-4337.70038>.

LILLO-PÉREZ, S. *et al.* Probiotics in fruit and vegetable matrices: opportunities for nondairy consumers. **LWT**. [s. l.]: Academic Press, v. 151, 2021. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2021.112106>.

LIM, M.; ASHOKKUMAR, M.; SON, Y. The effects of liquid height/volume, initial concentration of reactant and acoustic power on sonochemical oxidation. **Ultrasonics Sonochemistry**, [s. l.], v. 21, n. 6, p. 1988–1993, 2014. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ultsonch.2014.03.005>.

LINDSAY, D. *et al.* Heat induced inactivation of microorganisms in milk and dairy products. **International Dairy Journal**, [s. l.], v. 121, p. 105096, 2021. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2021.105096>.

LINHARES, M. D. F. D. *et al.* Influence of sugar addition in Kombucha production regarding the beverage effect on human fecal microbiota composition and metabolite profile. **Food Bioscience**, [s. l.], v. 68, p. 106519, 2025. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.fbio.2025.106519>.

LIU, L. *et al.* The health benefits of fermented fruits and vegetables and their underlying mechanisms. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, [s. l.], v. 23, 2024. DOI: <https://doi.org/10.1111/1541-4337.70072>.

LIU, Y.; WANG, J.; WU, C. Modulation of gut microbiota and immune system by

probiotics, pre-biotics, and post-biotics. **Frontiers in Nutrition**, [s. l.], v. 8, p. 634897, 2022. DOI: <https://doi.org/10.3389/FNUT.2021.634897>.

LOUIS, P.; FLINT, H. J. Formation of propionate and butyrate by the human colonic microbiota. **Environmental Microbiology**, [s. l.], v. 19, n. 1, p. 29-41, 2017. DOI: <https://doi.org/10.1111/1462-2920.13589>.

LUCAS-GONZÁLEZ, R. *et al.* *In vitro* digestion models suitable for foods: Opportunities for new fields of application and challenges. **Food Research International**, [s. l.], v. 107, n. 5, p. 423-436, 2018. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2018.02.055>.

LUND, P. A. *et al.* Understanding how microorganisms respond to acid stress is essential for food safety. **Frontiers in Microbiology**, [s. l.], v. 11, p. 556140, 2020. DOI: <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.556140>.

LUO, Y. *et al.* Antibacterial activity and storage stability of an ultrasound-prepared postbiotic from *Lactiplantibacillus plantarum* SC019. **Food Bioscience**, [s. l.], v. 80, p. 108847, 2026. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.fbio.2026.108847>.

MA, T. *et al.* Targeting gut microbiota and metabolism as the major probiotic mechanism - An evidence-based review. **Trends in Food Science & Technology**, [s. l.], v. 138, p. 178-198, 2023. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2023.06.013>.

MACIEL DA SILVA, R.; HENRIQUE CAMPELO, P.; RODRIGUES, S. *In vitro* viability of *Lactobacillus casei* B-442 and fructooligosaccharides integrity in Amazonian sapota-do-solimões functional juice. **Food Research International**, [s. l.], v. 154, p. 111036, 2022. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2022.111036>.

MAIA, D. L. H.; RODRIGUES, S.; FERNANDES, F. A. N. Effect of low-frequency high-power ultrasound processing on the volatile compounds and aroma profile of cashew apple juice. **ACS Food Science & Technology**, [s. l.], v. 4, n. 6, p. 1560–1569, 2024. DOI: <https://doi.org/10.1021/acsfoodscitech.4c00152>.

MAJKUT, M. *et al.* Antimicrobial activity of heat-treated Polish honeys. **Food Chemistry**, [s. l.], v. 343, p. 128561, 2021. DOI: <https://doi.org/10.1016/J.FOODCHEM.2020.128561>.

MANOJ, P. M. *et al.* Fruit based probiotic functional beverages: a review. **Journal of Agriculture and Food Research**, [s. l.], v. 14, 2023. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jafr.2023.100729>.

MARKOWIAK-KOPEĆ, P.; ŚLIŻEWSKA, K. The effect of probiotics on the production of short-chain fatty acids by human intestinal microbiome. **Nutrients**, [s. l.], v. 12, n. 4, p. 1107, 2020. DOI: <https://doi.org/10.3390/nu12041107>.

MASON, T. J.; LORIMER, J. P. Applied sonochemistry: uses of power ultrasound in chemistry and processing. **Weinheim: Wiley-VCH**, [s. l.], 2003. DOI: <https://doi.org/10.1002/352760054X>.

MERONI, D. *et al.* Sonoprocessing: from concepts to large-scale reactors. **Chemical Reviews**, [s. l.], v. 122, n. 3, p. 3219–3258, 2021. DOI: <https://doi.org/10.1021/acs.chemrev.1c00438>.

MGOMA, S. T. *et al.* A systematic review on sustainable extraction, preservation, and enhancement in food processing: the advancement from conventional to green technology through ultrasound. **Processes**, [s. l.], v. 13, n. 4, 2025. DOI: <https://doi.org/10.3390/pr13040965>.

MONTEIRO, M. L. G. *et al.* What do consumers think about foods processed by ultraviolet radiation and ultrasound? **Foods**, [s. l.], v. 11, n. 3, p. 434, 2022. DOI: <https://doi.org/10.3390/FOODS11030434>.

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**, [s. l.], v. 120, p. 107555, 2021. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2020.107555>.

MÜLDÜR, D. Y.; ERBAY, Z.; YAVAŞ, A.; AKAN, E. Comparative analysis of thermal and ultrasound inactivation of *Lactobacillus acidophilus* LA-5: Viability by flow cytometry and plate count, and postbiotic functional properties. **Food Research International**, [s. l.], v. 220, p. 117073, 2025. DOI: <https://doi.org/10.1016/J.FOODRES.2025.117073>.

MUÑOZ, A. *et al.* Effects on *Escherichia coli* inactivation and quality attributes in apple juice treated by combinations of pulsed light and thermosonication. **Food Research International**, [s. l.], v. 45, n. 1, p. 299–305, 2012. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2011.08.020>.

MURALI, S. K.; MANSELL, T. J. Next generation probiotics: engineering live biotherapeutics. **Biotechnology Advances**, [s. l.], v. 72, 2024. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2024.108336>.

NAGY, D. *et al.* Comparison of the Bactericidal Effect of Ultrasonic and Heat Combined with Ultrasonic Treatments on Egg Liquids and Additional Analysis of Their Effect by NIR Spectral Analysis. **Sensors**, [s. l.], v. 24, n. 14, p. 4547, 2024. DOI: <https://doi.org/10.3390/S24144547>.

NASCIMENTO, C. S. DO *et al.* From probiotic to postbiotic: conversion of acerola juice by thermosonication. **Processes**, [s. l.], v. 13, p. 2122, 2025. DOI: <https://doi.org/10.3390/pr13072122>.

NASCIMENTO, C.; SANTOS, B. N.; RODRIGUES, S. High-intensity ultrasound processed acerola juice containing oligosaccharides and dextran promotes *Lactocaseibacillus casei* NRRL B-442 growth. **International Journal of Food Science & Technology**, [s. l.], v. 57, n. 7, p. 4153–4161, 2022. DOI: <https://doi.org/10.1111/IJFS.15829>.

NASEEM, Z. *et al.* Probiotic-fortified fruit juices: health benefits, challenges, and future perspective. **Nutrition**, [s. l.], v. 115, 2023. DOI:

<https://doi.org/10.1016/j.nut.2023.112154>.

NASIR, G. *et al.* Current status of technological advancement of ultrasound processing in the food industry and its SWOT analysis. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, [s. l.], 2025. DOI: <https://doi.org/10.1080/10408398.2024.2405992>.

NATARAJ, B. H. *et al.* Postbiotics-parabiotics: the new horizons in microbial biotherapy and functional foods. **Microbial Cell Factories**, [s. l.], v. 19, p. 168, 2020. DOI: <https://doi.org/10.1186/s12934-020-01426-w>.

NENG, X. *et al.* Ultrasound enhances the probiotic properties and anti-inflammatory function of *Lactocaseibacillus rhamnosus* 1.0320 by releasing functional metabolites. **Food Bioscience**, [s. l.], v. 76, p. 108293, 2026. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.fbio.2026.108293>.

NONGLAIT, D. L. *et al.* Emerging non-thermal technologies for enhanced quality and safety of fruit juices. **International Journal of Food Science and Technology**, [s. l.], v. 57, n. 10, p. 6368–6377, 2022. DOI: <https://doi.org/10.1111/ijfs.16017>.

NUNES, B. V. *et al.* Microbiological inactivation by ultrasound in liquid products. **Food and Bioprocess Technology**, [s. l.], v. 15, p. 1–16, 2022. DOI: <https://doi.org/10.1007/s11947-022-02818-z>.

ODRIOZOLA-SERRANO, I. *et al.* Stability and bioaccessibility of phenolic compounds in rosehip extracts during *in vitro* digestion. **Antioxidants**, [s. l.], v. 12, n. 5, p. 1035, 2023. DOI: <https://doi.org/10.3390/antiox12051035>.

OLIPHANT, K.; ALLEN-VERCOE, E. Macronutrient metabolism by the human gut microbiome: major fermentation by-products and their impact on host health. **Microbiome**, [s. l.], v. 7, n. 1, p. 91, 2019. DOI: <https://doi.org/10.1186/s40168-019-0704-8>.

OLIVEIRA, A. F. A. *et al.* Non-thermal combined treatments in the processing of açai (*Euterpe oleracea*) juice. **Food Chemistry**, [s. l.], v. 265, p. 57–63, 2018. DOI: <https://doi.org/10.1016/J.FOODCHEM.2018.05.081>.

OLIVEIRA, G. A. R. *et al.* Benefits of thermosonication in orange juice whey drink processing. **Innovative Food Science and Emerging Technologies**, [s. l.], v. 75, p. 102876, 2022. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ifset.2021.102876>.

OZDAL, T.; CAPANOGLU, E.; ALTAY, F. A review on protein-phenolic interactions and associated changes. **Food Research International**, [s. l.], v. 51, n. 2, p. 954–970, 2013. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2013.02.009>.

PANARO, E. *et al.* The power of thermosonication on quality preservation and *Listeria* control of blueberry juice. **Foods**, [s. l.], v. 13, n. 22, p. 3564, 2024. DOI: <https://doi.org/10.3390/FOODS13223564>.

PANIGRAHI, C.; KAUR, G.; SAHOO, M. Recent advancements in applications of ozone technology in juice and beverage processing: a review. **Journal of Food Process**

Engineering, [s. l.], v. 48, n. 3, p. e70074, 2025. DOI: <https://doi.org/10.1111/jfpe.70074>.

PARK, J. *et al.* Heat-treated brown rice starch structure and effect on short-chain fatty acids and mouse intestinal microbiota. **International Journal of Biological Macromolecules**, [s. l.], v. 283, 2024. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2024.137597>.

PAVLOVA, A. S. *et al.* Identification of antimicrobial peptides from novel *Lactobacillus fermentum* strain. **Protein Journal**, [s. l.], v. 39, n. 1, p. 73–84, 2020. DOI: <https://doi.org/10.1007/s10930-019-09879-8>.

PELUZIO, M. DO C. G.; MARTINEZ, J. A.; MILAGRO, F. I. Postbiotics: metabolites and mechanisms involved in microbiota-host interactions. **Trends in Food Science & Technology**, [s. l.], v. 108, p. 11–26, 2021. DOI: <https://doi.org/10.1016/J.TIFS.2020.12.004>.

PEREIRA, A. L. F. *et al.* Impact of fermentation conditions on the quality and sensory properties of a probiotic cupuassu (*Theobroma grandiflorum*) beverage. **Food Research International**, [s. l.], v. 100, p. 603–611, 2017. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2017.07.055>.

PEREIRA, A. L. F.; MACIEL, T. C.; RODRIGUES, S. Probiotic beverage from cashew apple juice fermented with *Lactobacillus casei*. **Food Research International**, [s. l.], v. 44, n. 5, p. 1276–1283, 2011. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2010.11.035>.

PEREIRA, A. L.; RODRIGUES, S. Turning fruit juice into probiotic beverages. In: **Fruit Juices: Extraction, Composition, Quality and Analysis**. [s. l.], p. 279–287, 2018. DOI: <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-802230-6.00015-1>.

PEREIRA, A. P. A. *et al.* Land degradation affects the microbial communities in the Brazilian Caatinga biome. **Catena**, [s. l.], v. 211, p. 105961, 2022. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.catena.2021.105961>.

PETRUZZI, L. *et al.* Thermal treatments for fruit and vegetable juices and beverages: a literature overview. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, [s. l.], v. 16, n. 4, p. 668–691, 2017. DOI: <https://doi.org/10.1111/1541-4337.12270>.

PIMENTEL, T. C. *et al.* Fruit juices as probiotic foods. In: **Sports and Energy Drinks: Volume 10: The Science of Beverages**. [s. l.]: Elsevier, p. 483–513, 2019. DOI: <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-815851-7.00014-0>.

PIMENTEL, T. C. *et al.* Postbiotics: an overview of concepts, inactivation technologies, health effects, and driver trends. **Trends in Food Science and Technology**, [s. l.], v. 138, p. 199–214, 2023. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2023.06.009>.

PIQUÉ, N.; BERLANGA, M.; MIÑANA-GALBIS, D. Health benefits of heat-killed (*tyndallized*) probiotics: an overview. **International Journal of Molecular Sciences**, [s. l.], v. 20, n. 10, p. 2534, 2019. DOI: <https://doi.org/10.3390/ijms20102534>.

PIYASENA, P.; MOHAREB, E.; MCKELLAR, R. C. Inactivation of microbes using ultrasound: A review. **International Journal of Food Microbiology**, [s. l.], v. 87, n. 3, p. 207–216, 2003. DOI: [https://doi.org/10.1016/S0168-1605\(03\)00075-8](https://doi.org/10.1016/S0168-1605(03)00075-8).

PLAMADA, D.; VODNAR, D. C. Polyphenols-Gut microbiota interrelationship: A transition to a new generation of prebiotics. **Nutrients**, [s. l.], v. 14, n. 1, p. 137, 2021. DOI: <https://doi.org/10.3390/nu14010137>.

POLAK, N.; KALISZ, S.; KRUSZEWSKI, B. High-temperature short-time and ultra-high-temperature processing of juices, nectars and beverages: influences on enzyme, microbial inactivation and retention of bioactive compounds. **Applied Sciences**, [s. l.], v. 14, n. 19, 2024. DOI: <https://doi.org/10.3390/app14198978>.

PRAJAPATI, N. *et al.* Postbiotic production: harnessing the power of microbial metabolites for health applications. **Frontiers in Microbiology**, [s. l.], v. 14, p. 1306192, 2023. DOI: <https://doi.org/10.3389/fmicb.2023.1306192>.

PRAKASH, A.; BASKARAN, R. Acerola, an untapped functional superfruit: a review on latest frontiers. **Journal of Food Science and Technology**, [s. l.], v. 55, n. 9, p. 3373–3384, 2018. DOI: <https://doi.org/10.1007/s13197-018-3309-5>.

QIN, D. *et al.* Influence of interactions between bubbles on physico-chemical effects of acoustic cavitation. **Ultrasonics Sonochemistry**, [s. l.], v. 104, p. 106808, 2024. DOI: <https://doi.org/10.1016/J.ULTSONCH.2024.106808>.

QIU, X. *et al.* Effects of thermosonication on the antioxidant capacity and physicochemical, bioactive, microbiological, and sensory qualities of blackcurrant juice. **Foods**, [s. l.], v. 13, n. 5, p. 809, 2024. DOI: <https://doi.org/10.3390/FOODS13050809>.

RAN-RESSLER, R. R. *et al.* Branched-chain fatty acid content of foods and estimated intake in the USA. **British Journal of Nutrition**, [s. l.], v. 112, n. 4, p. 565–572, 2014. DOI: <https://doi.org/10.1017/s0007114514001081>.

RASIKA, D. M. *et al.* Plant-based milk substitutes as emerging probiotic carriers. **Current Opinion in Food Science**, [s. l.], v. 38, p. 8–20, 2021. DOI: <https://doi.org/10.1016/J.COFS.2020.10.025>.

RATHNAYAKE, P. Y. *et al.* Application of thermo-cylindrical type focused-ultrasound as novel milk pasteurization: microbial inactivation, immunoglobulin G retention, and physicochemical characteristics. **Ultrasonics Sonochemistry**, [s. l.], v. 123, p. 107615, 2025. DOI: <https://doi.org/10.1016/J.ULTSONCH.2025.107615>.

REGES, B. M. *et al.* Impact of ultrasound processing of açai juice containing complex carbohydrates in human intestinal microbiota composition and metabolite production. **Food Bioscience**, [s. l.], v. 56, p. 103240, 2023. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.fbio.2023.103240>.

REICHARDT, N. *et al.* Phylogenetic distribution of three pathways for propionate production within the human gut microbiota. **The ISME Journal**, [s. l.], v. 8, n. 6, p. 1323–1335, 2014. DOI: <https://doi.org/10.1038/ismej.2014.14>.

- REŽEK JAMBRAK, A.; DA CRUZ, A. G.; CHEN, J. Ultrasonic food processing as a green and sustainable technology. **Ultrasonics Sonochemistry**, [s. l.], v. 106, p. 106880, 2024. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ultsonch.2024.106880>.
- RIOS-COVIAN, D. *et al.* An overview on fecal branched short-chain fatty acids along human life and as related with body mass index: Associated dietary and anthropometric factors. **Frontiers in Microbiology**, [s. l.], v. 11, p. 513909, 2020. DOI: <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.00973>.
- RIVERA-CHÁVEZ, F. *et al.* Depletion of butyrate-producing Clostridia from the gut microbiota drives an aerobic luminal expansion of *Salmonella*. **Cell Host and Microbe**, [s. l.], v. 19, n. 4, p. 443-454, 2016. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.chom.2016.03.004>.
- RODRIGUES DE PAIVA, I. H.; DUARTE-SILVA, E.; ALVES PEIXOTO, C. Remember the gut: The emerging role of microbial SCFAs in cognitive health. **Food Bioscience**, [s. l.], v. 74, p. 107838, 2025. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.fbio.2025.107838>.
- RODRIGUES, V. C. DA C. *et al.* Survival, metabolic status and cellular morphology of probiotics in dairy products and dietary supplement after simulated digestion. **Journal of Functional Foods**, [s. l.], v. 55, p. 126–134, 2019. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jff.2019.01.046>.
- RODRÍGUEZ-ROMERO, J. DE J. *et al.* *In vitro* gastrointestinal digestion affects the bioaccessibility of bioactive compounds in *Hibiscus sabdariffa* beverages. **Molecules**, [s. l.], v. 28, n. 4, p. 1824, 2023. DOI: <https://doi.org/10.3390/molecules28041824>.
- ROSELLI, M. *et al.* Colonization ability and impact on human gut microbiota of foodborne microbes from traditional or probiotic-added fermented foods: a systematic review. **Frontiers in Nutrition**, [s. l.], v. 8, p. 689084, 2021. DOI: <https://doi.org/10.3389/FNUT.2021.689084>.
- SABAN GÜLER, M. *et al.* Butyrate: A potential mediator of obesity and microbiome via different mechanisms of actions. **Food Research International**, [s. l.], v. 199, p. 115420, 2025. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2024.115420>.
- SAHOO, S. *et al.* *Lactobacillus casei* modulates gut health against Alzheimer's disease: A neurodevelopmental approach. **Discover Applied Sciences**, [s. l.], v. 7, n. 9, p. 1007, 2025. DOI: <https://doi.org/10.1007/s42452-025-07624-8>.
- SAINI, R. K. *et al.* Bioactive compounds of citrus fruits: a review of composition and health benefits of carotenoids, flavonoids, limonoids, and terpenes. **Antioxidants**, [s. l.], v. 11, 2022. DOI: <https://doi.org/10.3390/antiox11020239>.
- SAKANAKA, A. *et al.* *Fusobacterium nucleatum* metabolically integrates commensals and pathogens in oral biofilms. **mSystems**, [s. l.], v. 7, n. 4, p. e00170-22, 2022. DOI: <https://doi.org/10.1128/msystems.00170-22>.
- SALMINEN, S. *et al.* The International Scientific Association of Probiotics and

Prebiotics (ISAPP) consensus statement on the definition and scope of postbiotics. **Nature Reviews Gastroenterology and Hepatology**, [s. l.], v. 18, n. 9, p. 649–667, 2021. DOI: <https://doi.org/10.1038/s41575-021-00440-6>.

SASIKUMAR, R.; PRADHAN, D.; DEKA, S. C. Effects of thermosonication process on inactivation of *Escherichia coli* and *Saccharomyces cerevisiae* and its survival kinetics modeling in khoonphal (*Haematocarpus validus*) juice to extend its shelf life. **Journal of Food Processing and Preservation**, [s. l.], v. 43, n. 11, p. e14220, 2019. DOI: <https://doi.org/10.1111/jfpp.14220>.

SCUDINO, H. *et al.* Effect of thermosonication on the bioactive peptide profile, volatile compounds, and fatty acid profile of Minas Frescal cheese. **International Dairy Journal**, [s. l.], v. 157, 2024. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2024.106009>.

SHARAFI, H. *et al.* The potential of postbiotics as a novel approach in food packaging and biopreservation: a systematic review of the latest developments. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, [s. l.], v. 64, n. 33, p. 12524–12554, 2024. DOI: <https://doi.org/10.1080/10408398.2023.2253909>.

SHARMA, R. *et al.* Microbial fermentation and its role in quality improvement of fermented foods. **Fermentation**, [s. l.], v. 6, n. 4, p. 106, 2020. DOI: <https://doi.org/10.3390/FERMENTATION6040106>.

SHI, Z. *et al.* More deterministic assembly constrains the diversity of gut microbiota in freshwater snails. **Frontiers in Microbiology**, [s. l.], v. 15, p. 1394463, 2024. DOI: <https://doi.org/10.3389/fmicb.2024.1394463>.

SHIN, G. Y.; YILDIZ, S.; FRANCO, B. G.; BARBOSA-CÁNOVAS, G. V. High-pressure, pulsed electric fields, and thermosonication processing of pineapple juice–coconut milk blend: Modeling microbial inactivation kinetics. **LWT**, [s. l.], v. 234, p. 118553, 2025. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2025.118553>.

SHIN, N. R.; WHON, T. W.; BAE, J. W. Proteobacteria: Microbial signature of dysbiosis in gut microbiota. **Trends in Biotechnology**, [s. l.], v. 33, n. 9, p. 496–503, 2015. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2015.06.011>.

SHIRKHAN, F. *et al.* The role of lactic acid bacteria in production of bioactive peptides in fermented milk with antioxidant and antidiabetic properties. **Journal of Food Measurement and Characterization**, [s. l.], v. 17, 2023. DOI: <https://doi.org/10.1007/s11694-023-01968-8>.

SHORI, A. B.; AL ZAHRANI, A. J. Non-dairy plant-based milk products as alternatives to conventional dairy products for delivering probiotics. **Food Science and Technology**, [s. l.], v. 42, p. e101321, 2022. DOI: <https://doi.org/10.1590/FST.101321>.

SILVA, F. V. M. *et al.* Thermal processes: pasteurization. In: **Encyclopedia of Food Microbiology**. 2. ed. [s. l.]: Elsevier Inc., p. 577–595, 2014. DOI: <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-384730-0.00404-3>.

SINGH, V. *et al.* Butyrate producers, "The Sentinel of Gut": Their intestinal significance

with and beyond butyrate, and prospective use as microbial therapeutics. **Frontiers in Microbiology**, [s. l.], v. 13, p. 1103836, 2023. DOI: <https://doi.org/10.3389/fmicb.2022.1103836>.

SINGLA, M.; SIT, N. Raising challenges of ultrasound-assisted processes and sonochemistry in industrial applications based on energy efficiency. In: **Energy Aspects of Acoustic Cavitation and Sonochemistry: Fundamentals and Engineering**. [s. l.], p. 349–373, 2022. DOI: <https://doi.org/10.1016/B978-0-323-91937-1.00017-7>.

SON, Y.; LIM, M.; ASHOKKUMAR, M.; KHIM, J. Geometric optimization of sonoreactors for the enhancement of sonochemical activity. **Journal of Physical Chemistry**, [s. l.], v. 115, n. 10, p. 4096–4103, 2011. DOI: <https://doi.org/10.1021/jp110319y>.

SORBARA, M. T.; PAMER, E. G. Interbacterial mechanisms of colonization resistance and the strategies pathogens use to overcome them. **Mucosal Immunology**, [s. l.], v. 12, n. 1, p. 1-9, 2018. DOI: <https://doi.org/10.1038/s41385-018-0053-0>.

SORO, A. B.; OLIVEIRA, M.; O'DONNELL, C. P.; TIWARI, B. K. Ultrasound assisted modulation of yeast growth and inactivation kinetics. **Ultrasonics Sonochemistry**, [s. l.], v. 80, p. 105819, 2021. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ultsonch.2021.105819>.

SOTELO-LARA, D. M. *et al.* Ultrasound and thermosonication as promising technologies for processing plant-based beverages: a review. **Food Technology and Biotechnology**, [s. l.], v. 62, p. 538–552, 2024. DOI: <https://doi.org/10.17113/ftb.62.04.24.8624>.

SULAIMAN, A.; SILVA, F. V. M. Ultrasound fundamentals and ultrasound-assisted food processing applications. **Processes**, [s. l.], v. 14, n. 6, p. 884, 2026. DOI: <https://doi.org/10.3390/pr14060884>.

SUN, Z. *et al.* Effect of thermal inactivation on antioxidant, anti-inflammatory activities and chemical profile of postbiotics. **Foods**, [s. l.], v. 12, 2023. DOI: <https://doi.org/10.3390/foods12193579>.

SZUTOWSKA, J. Functional properties of lactic acid bacteria in fermented fruit and vegetable juices: a systematic literature review. **European Food Research and Technology**, [s. l.], v. 246, n. 3, p. 357–372, 2020. DOI: <https://doi.org/10.1007/s00217-019-03425-7>.

TAYLOR, R. H.; ALLEN, M. J.; GELDREICH, E. E. Standard plate count: A comparison of pour plate and spread plate methods. **Journal of the American Water Works Association**, [s. l.], v. 75, n. 1, p. 35–37, 1983. DOI: <https://doi.org/10.1002/j.1551-8833.1983.tb05055.x>.

TEGEGNE, B. A.; KEBEDE, B. Probiotics, their prophylactic and therapeutic applications in human health development: a review of the literature. **Heliyon**, [s. l.], v. 8, 2022. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2022.e09725>.

TERPOU, A. *et al.* Probiotics in food systems: significance and emerging strategies towards improved viability and delivery of enhanced beneficial value. **Nutrients**, [s. l.], v. 11, n. 7, p. 1591, 2019. DOI: <https://doi.org/10.3390/NU11071591>.

THORAKKATTU, P. *et al.* Postbiotics: current trends in food and pharmaceutical industry. **Foods**, [s. l.], v. 11, n. 19, 2022. DOI: <https://doi.org/10.3390/foods11193094>.

TIAN, X. *et al.* The supplement of vitamin C facilitates L-lactic acid biosynthesis in *Lactobacillus thermophilus* A69 from sweet sorghum juice coupled with soybean hydrolysate as feedstocks. **Industrial Crops and Products**, [s. l.], v. 146, p. 112159, 2020. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2020.112159>.

TIENCHEU, B. *et al.* Nutritional, sensory, physico-chemical, phytochemical, microbiological and shelf-life studies of natural fruit juice formulated from orange (*Citrus sinensis*), lemon (*Citrus limon*), honey and ginger (*Zingiber officinale*). **Heliyon**, [s. l.], v. 7, 2021. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2021.e07177>.

TOURNAS, V. H.; HEERES, J.; BURGESS, L. Moulds and yeasts in fruit salads and fruit juices. **Food Microbiology**, [s. l.], v. 23, n. 7, p. 684–688, 2006. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.fm.2006.01.003>.

TRAN, A. M. *et al.* Changes in bitterness, antioxidant activity and total phenolic content of grapefruit juice fermented by *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* strains. **Acta Alimentaria**, [s. l.], v. 49, n. 1, p. 103–110, 2020. DOI: <https://doi.org/10.1556/066.2020.49.1.13>.

TUMBARSKI, Y. *et al.* Characterization and selection of *Lactobacillus* strains with potential probiotic applications. **Applied Sciences**, [s. l.], v. 15, 2025. DOI: <https://doi.org/10.3390/app15062902>.

ULLAH, N. *et al.* Purification and primary characterization of a novel bacteriocin, LiN333, from *Lactobacillus casei*, an isolate from a Chinese fermented food. **LWT**, [s. l.], v. 84, p. 867–875, 2017. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2017.04.056>.

VAMANU, E.; DINU, L. D. *In vitro* modulation processes, prebiotic vs. postbiotic, of microbiota pattern: a preliminary study. **Nutraceuticals**, [s. l.], v. 5, n. 4, p. 30–48, 2025. DOI: <https://doi.org/10.3390/NUTRACEUTICALS5040030>.

VENTURA, I. *et al.* Therapeutic and immunologic effects of short-chain fatty acids in inflammatory bowel disease: a systematic review. **International Journal of Molecular Sciences**, [s. l.], v. 25, n. 20, 2024. DOI: <https://doi.org/10.3390/IJMS252010879>.

VIGNALI, G. *et al.* Non-conventional stabilization for fruit and vegetable juices: overview, technological constraints, and energy cost comparison. **Food and Bioprocess Technology**, [s. l.], v. 15, n. 8, p. 1729–1747, 2022. DOI: <https://doi.org/10.1007/s11947-022-02772-w>.

VYAS, N. *et al.* The effect of standoff distance and surface roughness on biofilm disruption using cavitation. **PLoS ONE**, [s. l.], v. 15, n. 7, p. e0236428, 2020. DOI:

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0236428>.

WANG, J.; VANGA, S. K.; RAGHAVAN, V. High-intensity ultrasound processing of kiwifruit juice: effects on the ascorbic acid, total phenolics, flavonoids and antioxidant capacity. **LWT**, [s. l.], v. 107, p. 299–307, 2019. DOI: <https://doi.org/10.1016/J.LWT.2019.03.024>.

WARDA, A. K. *et al.* A postbiotic consisting of heat-treated lactobacilli has a bifidogenic effect in pure culture and in human fermented fecal communities. **Applied and Environmental Microbiology**, [s. l.], v. 87, n. 8, p. e02459-20, 2021. DOI: <https://doi.org/10.1128/aem.02459-20>.

WEIBULL, W. A statistical distribution function of wide applicability. **Journal of Applied Mechanics**, [s. l.], v. 18, n. 3, p. 293–297, 1951. DOI: <https://doi.org/10.1115/1.4010337>.

WEXLER, H. M. Bacteroides: The good, the bad, and the nitty-gritty. **Clinical Microbiology Reviews**, [s. l.], v. 20, n. 4, p. 593–621, 2007. DOI: <https://doi.org/10.1128/cmr.00008-07>.

WIBOWO, M. J. *et al.* Combination of thermal and non-thermal pasteurization of *siam semboro* orange juice. **IOP Conference Series: Earth and Environmental Science**, [s. l.], v. 1446, p. 012033, 2025. DOI: <https://doi.org/10.1088/1755-1315/1446/1/012033>.

WINDEY, K.; DE PRETER, V.; VERBEKE, K. Relevance of protein fermentation to gut health. **Molecular Nutrition and Food Research**, [s. l.], v. 56, n. 1, p. 184–196, 2012. DOI: <https://doi.org/10.1002/mnfr.201100542>.

WU, F. *et al.* *Phascolarctobacterium faecium* abundant colonization in human gastrointestinal tract. **Experimental and Therapeutic Medicine**, [s. l.], v. 14, n. 4, p. 3122–3126, 2017. DOI: <https://doi.org/10.3892/etm.2017.4878>.

WU, M. *et al.* Research progress on the effects of thermosonication on the sterilization and quality of liquid foods. **Journal of Food Process Engineering**, [s. l.], v. 48, n. 7, p. e70189, 2025. DOI: <https://doi.org/10.1111/jfpe.70189>.

WU, T. *et al.* Modulation of gut microbiota by *Lactobacillus casei* fermented raspberry juice in vitro and in vivo. **Foods**, [s. l.], v. 10, n. 12, 2021. DOI: <https://doi.org/10.3390/FOODS10123055>.

WU, Y. *et al.* Effect of thermosonication treatment on blueberry juice quality: total phenolics, flavonoids, anthocyanin, and antioxidant activity. **LWT**, [s. l.], v. 150, 2021. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2021.112021>.

XIA, M. *et al.* Benefits of heat-killed *Lactobacillus acidophilus* on growth performance, nutrient digestibility, antioxidant status, immunity, and cecal microbiota of rabbits. **Frontiers in Veterinary Science**, [s. l.], v. 11, p. 1361908, 2024. DOI: <https://doi.org/10.3389/FVETS.2024.1361908>.

XIAO, L. *et al.* Effects of *Lacticaseibacillus paracasei* SNB-derived postbiotic

components on intestinal barrier dysfunction and composition of gut microbiota. **Food Research International**, [s. l.], v. 175, p. 113773, 2024. DOI: <https://doi.org/10.1016/J.FOODRES.2023.113773>.

XU, H. *et al.* Change of phytochemicals and bioactive substances in *Lactobacillus* fermented *Citrus* juice during the fermentation process. **LWT**, [s. l.], v. 180, 2023. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2023.114715>.

XU, J.; LU, Y. The microbiota-gut-brain axis and central nervous system diseases: from mechanisms of pathogenesis to therapeutic strategies. **Frontiers in Microbiology**, [s. l.], v. 16, p. 1583562, 2025. DOI: <https://doi.org/10.3389/FMICB.2025.1583562>.

XUE, X. *et al.* Purification, characterization, and identification of a novel bacteriocin produced by *Lactocaseibacillus casei* KLS1, and its antimicrobial mechanism against *Staphylococcus aureus*. **LWT**, [s. l.], v. 200, 2024. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2024.116207>.

YANG, E. *et al.* Influence of culture media, pH and temperature on growth and bacteriocin production of bacteriocinogenic lactic acid bacteria. **AMB Express**, [s. l.], v. 8, n. 1, 2018. DOI: <https://doi.org/10.1186/s13568-018-0536-0>.

YEŞİLYURT, N. *et al.* Involvement of probiotics and postbiotics in the immune system modulation. **Biologics**, [s. l.], v. 1, n. 2, p. 89–110, 2021. DOI: <https://doi.org/10.3390/biologics1020006>.

YIKMIŞ, S. *et al.* Advancing sustainable food preservation: ultrasound and thermosonication as novel approaches to enhance nutritional and bioactive properties of broccoli juice. **Food Chemistry: X**, [s. l.], v. 27, p. 102412, 2025. DOI: <https://doi.org/10.1016/J.FOCHX.2025.102412>.

YOLMEH, M. *et al.* Paraprobiotics retain their ability to counteract diet-induced dysbiosis during shelf-life: an efficacy study correlating fecal metabolomic and microbiome changes. **Food Bioscience**, [s. l.], v. 80, p. 108947, 2026. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.fbio.2026.108947>.

ZANEVELD, J. R.; MCMINDS, R.; THURBER, R. V. Stress and stability: Applying the Anna Karenina principle to animal microbiomes. **Nature Microbiology**, [s. l.], v. 2, n. 9, p. 17121, 2017. DOI: <https://doi.org/10.1038/nmicrobiol.2017.121>.

ZHAO, F.; WANG, Z.; HUANG, H. Physical cell disruption technologies for intracellular compound extraction from microorganisms. **Processes**, [s. l.], v. 12, n. 10, p. 2059, 2024. DOI: <https://doi.org/10.3390/pr12102059>.

ZHAO, M. *et al.* Immunological mechanisms of inflammatory diseases caused by gut microbiota dysbiosis: A review. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, [s. l.], v. 164, p. 114985, 2023. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2023.114985>.

ZHU, Y. *et al.* The role of inactivation methods in shaping postbiotic composition and modulating bioactivity: a review. **Foods**, [s. l.], v. 14, n. 13, p. 2358, 2025. DOI: <https://doi.org/10.3390/FOODS14132358>.

ZIA, H. *et al.* A review study on the effects of thermal and non-thermal processing techniques on the sensory properties of fruit juices and beverages. **Frontiers in Food Science and Technology**, [s. l.], v. 4, p. 1405384, 2024. DOI: <https://doi.org/10.3389/frfst.2024.1405384>.

ZÓŁKIEWICZ, J. *et al.* Postbiotics-a step beyond pre-and probiotics. **Nutrients**, [s. l.], 2020. DOI: <https://doi.org/10.3390/nu12082189>.

ZOU, Y.; JIANG, A. Effect of ultrasound treatment on quality and microbial load of carrot juice. **Food Science and Technology**, [s. l.], v. 36, n. 1, p. 111–115, 2016. DOI: <https://doi.org/10.1590/1678-457X.0061>.