

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO**  
**CENTRO DE BIOCIÊNCIAS**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA**

**MARYANA ROGÉRIA DOS SANTOS**

**A INFLUÊNCIA DAS CONCENTRAÇÕES DA POLPA E DA PECTINA DO  
MARACUJÁ DA CAATINGA (*Passiflora cincinnata* Mast.) NA SOBREVIVÊNCIA DE  
*Lactobacillus rhamnosus* ATCC 7469 EM BEBIDAS SIMBIÓTICAS**

**RECIFE**  
**2022**

**MARYANA ROGÉRIA DOS SANTOS**

**A INFLUÊNCIA DAS CONCENTRAÇÕES DA POLPA E DA PECTINA DO  
MARACUJÁ DA CAATINGA (*Passiflora cincinnata* Mast.) NA SOBREVIVÊNCIA DE  
*Lactocaseibacillus rhamnosus* ATCC 7469 EM BEBIDAS SIMBIÓTICAS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia da Universidade Federal de Pernambuco, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Biotecnologia. Área de concentração: Microbiologia, Bioprocessos e Bioprodutos.

Orientadora: Prof.<sup>a</sup>. Dra. Ester Ribeiro de Andrade

**RECIFE**

**2022**

.Catalogação de Publicação na Fonte. UFPE - Biblioteca Central

Santos, Maryana Rogéria Dos.

A influência das concentrações da polpa e da pectina do maracujá da Caatinga (*Passiflora cincinnata* Mast.) na sobrevivência de *Lactobacillus rhamnosus* ATCC 7469 em bebidas simbióticas / Maryana Rogéria Dos Santos. - Recife, 2022.

73f.: il.

Dissertação (Mestrado)- Universidade Federal de Pernambuco, Centro de Biociências, Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia, 2022.

Orientação: Ester Ribeiro de Andrade.

1. Prebiótico; 2. Probiótico; 3. Bebida fermentada. I. Andrade, Ester Ribeiro de. II. Título.

UFPE-Biblioteca Central

**MARYANA ROGÉRIA DOS SANTOS**

**A INFLUÊNCIA DAS CONCENTRAÇÕES DA POLPA E DA PECTINA DO  
MARACUJÁ DA CAATINGA (*Passiflora cincinnata* Mast.) NA SOBREVIVÊNCIA DE  
*Lactobacillus rhamnosus* ATCC 7469 EM BEBIDAS SIMBIÓTICAS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia da Universidade Federal de Pernambuco, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Biotecnologia. Área de concentração: Microbiologia, Bioprocessos e Bioprodutos.

Aprovado em: 22/08/2022

**COMISSÃO EXAMINADORA**

---

Prof.<sup>a</sup>. Dra. Ester Ribeiro de Andrade (Orientadora)  
Universidade Federal de Pernambuco

---

Prof.<sup>a</sup>. Dra. Norma Buarque de Gusmão  
Universidade Federal de Pernambuco

---

Prof.<sup>a</sup>. Dra. Christine Lamenha Luna Finkler  
Universidade Federal de Pernambuco - CAV

Recife, 22 de agosto de 2022.

## AGRADECIMENTOS

Dou início aos meus agradecimentos sendo grata à Deus por toda força que foi emanada a mim, pela companhia em momentos felizes e de solidão, por toda luz que me abraçou em momentos de tristeza, pela proteção em períodos de medo e pelo acolhimento diante de tantas incertezas. Obrigada, paizinho, por se fazer presente em todos os momentos da minha vida, inclusive nesses 2 anos e meio de mestrado que não foram nada fáceis. Tua presença em minha vida é essencial.

Agradeço aos meus avós que não estão mais em terra, mas que constituem grande parte da minha força. Grande parte da minha coragem vem deles, pois a cada desafio tento me enxergar como eles me enxergavam. As lembranças dos abraços, dos cheiros, das risadas, das conversas, dos olhares, estão guardadas comigo e são um empurrãozinho pra enfrentar os meus medos. Luzinete, Otacílio e Severino, amo vocês eternamente.

Agradeço aos meus pais pelo apoio diário, pela preocupação em me ver bem e pelo amor em forma de atitude. Sei que pra vocês esse período também foi difícil e, desde já, peço desculpas por momentos de impaciência e isolamento da minha parte. Obrigada por fazerem o que podem pra me ajudar, quero poder retribuir tudo isso a vocês. Em especial quero agradecer a Mainha por pegar na minha mão e caminhar comigo numa estrada que ela não conhece tão bem e enfrentar meus monstros junto a mim. Te amo, Mainha.

Quero também deixar registrado minha imensa gratidão à minha família. Eles são meu xodó, são meu ponto fraco. Sou apaixonada pela união que existe entre os irmãos da minha mãe e pelas histórias que eles sempre contam quando estão reunidos. Eles me ensinam e me inspiram a ser um ser humano melhor a cada discurso que dão em pequenas farras na casa de tia Lourdes. Vejo meu vô Otacílio em cada um deles e isso aquece meu coração. Obrigada por todo cuidado e conselhos. Amo vocês.

Aos meus primos, que são irmãos de coração, quero deixar meu obrigada por deixarem tudo mais leve. Vocês são extremamente importantes na minha vida, são grandes exemplos. Admiro cada um do seu jeitinho. Vocês me ensinam, vocês me escutam, vocês me entendem e estão sempre por perto (mesmo os mais distantes). Quero agradecer a Alê, que além de prima é minha madrinha, que já viveu tantas coisas e sempre tem algo pra falar, seja pra incentivar, seja pra acalantar. Te amo, Madri, você é sinônimo de força pra mim. A meu primo Wendell que também é um primo-irmão, que tem o coração maior do mundo e que tem uma essência

totalmente Otacília kkkk. Um coração enorme que se pôs tantas vezes a disposição pra conversar comigo quando eu mais precisava nesse período de pandemia. Brigada por tudo, Dell, teu coração é lindo demais. Quero agradecer a Bira, que me tirou de um lugarzinho que eu nem sabia que tava, olhou pra mim com seu olhar médico e agiu como irmão. Te amo demais, Bira. Pode ter certeza que você teve um papel importante para que essa etapa da minha vida se concretizasse e eu sou grata demais por tudo, tudo, tudo que tu fez e faz sempre por mim. Não posso deixar de agradecer a July, Karynne, Karol, Wli, Wagner, Larissa, Gigi e Victor, por trazer alegria em tantos momentos. Vocês moram em meu coração.

Quero agradecer aos meus amigos que são uma família que escolhi. Eles que acompanharam de perto minhas aflições e vibram com minhas conquistas. Eles que também são inspirações pra mim. Quero agradecer a Paloma, minha amizade eterna e sólida, minha amiga que, mesmo com todas as distâncias da vida, continua pertinho. Obrigada, amiga, por se fazer presente, por ser tão acolhedora, por me ouvir e compartilhar comigo tuas conquistas e anseios. Sinto uma leveza na nossa amizade e isso é valioso demais pra mim, amo você. Quero agradecer a Mickey, por estar comigo nos melhores e piores momentos, e mesmo de longe se fazer presente. A gente sabe que pode contar um com o outro, eu te agradeço demais por essa troca durante essa jornada. Te amo mil milhões.

Quero agradecer aos meus distribuidores de amor e zoeira, por tornarem minha fase universitária tão mais feliz. Durante a graduação foram essenciais e durante o mestrado não deixaram de ser. Amigos que admiro pela trajetória, pela força, pela inteligência e por serem do jeitinho que são. Eu amo tanto vocês. Minha Akemi, obrigada pelo cuidado de sempre, pelos abraços quentinhos e pela boa energia que traz consigo, você é um cobertozinho que vou querer carregar pra sempre. Vit, obrigada por ser essa amiga cheia de leveza dentro de si, minha amiga virginiana que compartilha dos mesmos tocs, que sabe divertir quem ta por perto e tem um abraço que acalma qualquer um. Mile, obrigada por ser aquela que escuta, aconselha, puxa a orelha e faz sorrir, aquela que sempre se fez presente. Val, te agradeço por cada conversinha/conselho, por cada gaiatice que me tirou gargalhadas e por cada explicação sobre algo que eu tinha dúvida do nada. Lipe, meu amor, obrigada por tu ser tu, você é uma imensidão, sorte te ter como amigo, seu coração juntinho do meu pra sempre. Érica, obrigada por trazer sinceridade e sorriso quando eu menos esperava, mesmo longe tu foi o que tu sempre foi, aquela que traz verdades e aleatoriedades, tu preenche meu coraçãozinho. Thaís, obrigada pela amizade e sintonia que a gente tem, brigada pelo choro e abraço de cada vez que a gente se viu, foram/são importantes pra mim. Math, obrigada por ser esse doidinho com o coração grande

que traz alegria do seu jeitinho. E obrigada a Rafa e Camis, que nunca deixaram de ser especiais pra mim, e que colocam um sorriso no meu rosto mesmo de longinho. Repito, amo cada um. A felicidade de vocês é a minha também.

Quero agradecer a Carol, que chegou bem no início disso tudo e foi essencial pra mim. Trouxe consigo tanto carinho e amor, me deu força e foi/é um abrigozinho em tantos momentos. Tudo ficou mais leve porque tu tava juntinho nessa, obrigada por ser tanto. Obrigada pelo incentivo de sempre e por me fazer acreditar que tudo é possível. Obrigada a Sav por ser um mix de força e coração mole, que assusta pela brabeza, mas que tem um abraço apertado que salva qualquer um. Obrigada a Manuzinha, por ser aquela amiga sensata, que entende, que defende, que conversa \*mais que tudo nessa vida\*, que torce e apoia. Vocês foram importantes nessa trajetória, e quero tê-las junto a mim pra sempre. Não posso esquecer de Fran, Bia, Quel, Bandeira, Luiz, Dandan, Vini, Hugo, Elly, Ítala, Sofi, Lucas e todos os caranguejinhos que, quando unidos, trazem sorriso pro meu rosto. Sou feliz com vocês por perto.

Quero agradecer a minha turma do mestrado, as meninas mais lindas da Biotec, pela troca e incentivo de sempre. Torço muito por vocês, meninas. Também quero agradecer aos meus amigos do LABBIO, Arthur, Gab, Eli, Roberta e Thayza, por toda parceria dentro e fora do laboratório. Obrigada por serem grandes colegas de fofoca (kkk), de experimentos, de estudos, de ideias. Durante esse período tudo que acontecia dentro do lab ficou mais divertido e leve porque vocês estavam por lá, então muito, muito, muito obrigada por cada gargalhada, comida dividida e abraços trocados. Em especial, quero agradecer a Roberta, por partilhar tantos momentos e aflições comigo, tantas polpas e pectinas retiradas (kkkk), tantas conversas e conselhos. Obrigada por tudo, Beta. Agradeço também a minha orientadora, Prof<sup>a</sup> Ester, que foi mãe/amiga/professora/orientadora, tudo em um combo só. Ela que, em vários momentos, conversou, escutou, aconselhou, puxou a orelha (quando necessário) e me ensinou tantas e tantas coisas. Os desafios e as barreiras da pós ficaram mais fáceis com ela do lado, obrigada, professora. Tenho admiração imensa pela profissional e pessoa Ester.

Quero agradecer a Ana, que foi minha psicóloga durante a quarentena, e foi de uma paciência tremenda, escutando todas as minhas aflições. Abriu minha cabeça para tantas coisas... Obrigada por ter aparecido nessa época, Ana. Saudades.

Sou as pessoas que encontro em meu caminho e sou eternamente grata por cada uma que esbarrou comigo nessa jornada.

## RESUMO

A junção de probióticos e prebióticos configura um simbiótico. A elaboração de bebidas simbióticas com matrizes alimentares não lácteas enfrenta desafios quanto à eficácia do produto e tempo de prateleira. Isso ocorre devido à viabilidade ser dependente de alguns fatores, como a composição do meio de cultura e o tipo de linhagem utilizado. Logo, o objetivo deste trabalho foi verificar a influência das concentrações da polpa e da pectina do maracujá da Caatinga BRS sertão forte (*Passiflora cincinnata* Mast.) na produção de bebidas fermentadas por *Lactobacillus rhamnosus* ATCC 7469. A extração da pectina da farinha da casca do maracujá da Caatinga foi realizada com ácido cítrico (0,75 M) em incubadora rotativa (50 °C e 150 rpm). Posteriormente foram produzidas as bebidas simbióticas, de acordo com um planejamento fatorial, variando as concentrações da polpa do maracujá (20, 35 e 50% v/v) e da pectina (5, 12,5 e 20 g/L). A viabilidade, o pH, as concentrações de frutose, glicose, ácido láctico, compostos fenólicos e açúcares redutores totais (ART) foram determinadas tanto após as fermentações, quanto com 28 dias de estoque refrigerado. A sobrevivência às condições gastrointestinais simuladas também foi determinada. O rendimento da pectina extraída foi de 70%, sendo a casca do maracujá um potencial fonte para produção de pectina comercial. As bebidas formuladas com 20% v/v de polpa apresentaram maior crescimento celular, alcançando uma viabilidade de 8,7 Log (UFC/mL), maior concentração de ácido láctico (9,22 g/L) e pH menor que 4,5. As maiores concentrações (35 e 50% v/v) apresentaram um crescimento reduzido, porém ainda assim maior que 7 Log (UFC/mL), podendo estar relacionado à maior concentração de substâncias fenólicas (24,1 e 28,3 mg GAE/100g, respectivamente). Todavia, a condição central (35% v/v) apresentou valores de ácido láctico e pH de 6,42 g/L e 4,8, respectivamente, constituindo um bom veículo. Durante o estoque refrigerado, a viabilidade e o pH mantiveram-se constantes em todas as condições, sendo observado que as concentrações de polpa e de pectina não apresentaram efeito significativo na sobrevivência. Em resposta ao planejamento fatorial, o consumo de ART durante o estoque foi afetado pelas concentrações de polpa e de pectina, sendo a condição com maior consumo a com 50% (v/v) de polpa e 20 g/L de pectina. Com relação à simulação gastrointestinal, a bebida com 35% (v/v) de polpa apresentou maior sobrevivência de *L. rhamnosus* ATCC 7469 (43,45%), e revelou ser a condição ideal para inserção dos probióticos. Esses resultados trazem um respaldo científico para otimizar as preparações de bebidas simbióticas não lácteas.

**Palavras-chave:** Prebiótico; Probiótico; Bebida fermentada.



## ABSTRACT

The combination of probiotics and prebiotics sets up a symbiotic. The development of symbiotic beverages with non-dairy food matrices faces challenges in terms of product effectiveness and shelf life. This is due to the viability being dependent on some factors, such as the composition of the culture medium and the type of strain used. Therefore, this work aimed to verify the influence of pulp and pectin concentrations from passion fruit from Caatinga BRS sertão forte (*Passiflora cincinnata* Mast.) on the production of fermented beverages by *Lactobacillus rhamnosus* ATCC 7469. passion fruit from the Caatinga was performed with citric acid (0.75 M) in a rotating incubator (50 °C and 150 rpm). Subsequently, the symbiotic drinks were produced, according to a factorial design, varying the concentrations of passion fruit pulp (20, 35 and 50% v/v) and pectin (5, 12.5 and 20 g/L). Viability, pH, fructose, glucose, lactic acid, phenolic compounds and total reducing sugars (ART) concentrations were determined both after fermentations and after 28 days of refrigerated storage. Survival to simulated gastrointestinal conditions was also determined. The yield of pectin extracted was 70%, with passion fruit peel being a potential source for commercial pectin production. Beverages formulated with 20% v/v pulp showed higher cell growth, reaching a viability of 8.7 Log (CFU/mL), higher concentration of lactic acid (9.22 g/L) and pH lower than 4.5. The highest concentrations (35 and 50% v/v) showed a reduced growth, but still greater than 7 Log (CFU/mL), which may be related to the higher concentration of phenolic substances (24.1 and 28.3 mg GAE/ 100g, respectively). However, the central condition (35% v/v) presented lactic acid and pH values of 6.42 g/L and 4.8, respectively, constituting a good vehicle. During refrigerated storage, viability and pH remained constant under all conditions, and it was observed that pulp and pectin concentrations had no significant effect on survival. In response to factorial design, ART consumption during storage was affected by pulp and pectin concentrations, with the highest consumption condition being with 50% (v/v) pulp and 20 g/L pectin. Regarding the gastrointestinal simulation, the beverage with 35% (v/v) of pulp showed higher survival of *L. rhamnosus* ATCC 7469 (43.45%), and proved to be the ideal condition for the insertion of probiotics. These results provide scientific support for optimizing non-dairy symbiotic beverage preparations.

**Keywords:** Prebiotic; Probiotic; Fermented drink.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

<b>Figura 1</b> – Fruto do Maracujá da Caatinga BRS SF ( <i>Passiflora cincinnata</i> Mast.).....	18
<b>Figura 2</b> – Esquema da fermentação homolática e heterolática.....	19
<b>Figura 3</b> – Esquema da estrutura da pectina demonstrando os três domínios: HG (homogalacturonana), RG1 (Ramnogalacturonana 1) e RG2 (Ramnogalacturonana 2).....	22
<b>Figura 4</b> – Esquema do processo para reativação de <i>Lacticaseibacillus rhamnosus</i> ATCC 7469 em caldo MRS a 37°C por 18 horas.....	29
<b>Figura 5</b> – Esquema da obtenção da farinha da casca do maracujá.....	30
<b>Figura 6</b> – Esquema da extração da pectina da farinha da casca do maracujá.....	31
<b>Figura 7</b> – Esquema da simulação gastrointestinal para verificação da resistência de <i>Lacticaseibacillus rhamnosus</i> ATCC 7469.....	34
<b>Figura 8</b> – Esquema para determinação de quantidade necessária de farinha e casca de maracujá da Caatinga na produção da bebida fermentada. ....	37
<b>Figura 9</b> – Viabilidade no início e final das fermentações variando a concentração da polpa. Para viabilidade/pH inicial e final de cada ensaio, diferentes letras minúsculas demonstram diferença estatística ( $P \leq 0,05$ ); e diferentes letras maiúsculas demonstram diferença estatística ( $P \leq 0,05$ ) entre os diferentes ensaios. A análise estatística foi baseada nos valores médios das replicatas de experimentos de mesma condição. ....	39
<b>Figura 10</b> – Concentração de compostos fenólicos totais antes e após 24 horas de fermentação. Para concentração de fenólicos inicial e final de cada ensaio, diferentes letras minúsculas demonstram diferença estatística ( $P \leq 0,05$ ); e diferentes letras maiúsculas demonstram diferença estatística ( $P \leq 0,05$ ) entre os diferentes grupos de concentrações. As letras A, B e C (maiúsculas ou minúsculas) representam os valores em ordem decrescente, onde A é o maior valor, B é menor que A e C menor que B. ....	44
<b>Figura 11</b> – Concentração de ácido lático e pH durante o período de estoque. Para os valores iniciais e finais de cada ensaio (para concentração de ácido lático e pH), diferentes letras minúsculas apresentam diferença estatística ( $p \leq 0,05$ ).....	50
<b>Figura 12</b> – Superfície de resposta obtida para a variação de ART em função das concentrações de polpa e pectina do maracujá da Caatinga durante período de estoque refrigerado das bebidas.....	53

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1</b> – Fatores e níveis do planejamento fatorial.....	33
<b>Tabela 2</b> – Matriz de planejamento para elaboração das bebidas.....	33
<b>Tabela 3</b> – Concentrações de glicose e frutose nos tempos inicial e final da fermentação e ácido láctico ao final do processo fermentativo.....	41
<b>Tabela 4</b> – Viabilidade inicial e final durante tempo de estoque.....	46
<b>Tabela 5</b> – Sobrevivência de <i>L. rhamnosus</i> ATCC 7469 no estoque refrigerado.....	47
<b>Tabela 6</b> – Efeitos dos fatores e erros padrão do modelo relacionado a sobrevivência pós período de estoque.....	48
<b>Tabela 7</b> – Percentual utilizado de ART (VART) durante o período de estoque refrigerado.....	51
<b>Tabela 8</b> – Efeito dos fatores e erros padrão relacionados ao consumo de ART durante estoque.....	52
<b>Tabela 9</b> – Análise de variância (ANOVA) para modelo polinomial de VART.....	52
<b>Tabela 10</b> – Viabilidade após passagem por simulação gastrointestinal.....	55
<b>Tabela 11</b> – Efeito dos fatores e erros padrão relacionados à viabilidade de <i>L. rhmanosus</i> ATCC 7469 após simulação gastrointestinal.....	55
<b>Tabela 12</b> – Análise de variância (ANOVA) para modelo polinomial da viabilidade pós simulação gastrointestinal.....	56

## **LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS**

<b>AGCC</b>	Ácidos Graxos De Cadeia Curta
<b>ANVISA</b>	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
<b>ART</b>	Açúcar Redutor Total
<b>ATCC</b>	American Type Culture Collection
<b>BRS SF</b>	Brasil Sertão Forte
<b>CLAE</b>	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
<b>EMBRAPA</b>	Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
<b>FOS</b>	Frutooligossacarídeos
<b>GOS</b>	Galactooligossacarídeos
<b>GE</b>	Grau de Esterificação
<b>HG</b>	Homogalacturonana
<b>MQ</b>	Média Quadrática
<b>RG1</b>	Ramnogalacturonana 1
<b>RG2</b>	Ramnogalacturonana 2
<b>TGI</b>	Trato Gastrointestinal
<b>UFC</b>	Unidade Formadora de Colônias

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO.....</b>	<b>14</b>
<b>2. OBJETIVOS.....</b>	<b>16</b>
2.1. Geral.....	16
2.2. Específicos.....	16
<b>3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....</b>	<b>17</b>
3.1. Maracujá da Caatinga e suas propriedades.....	17
3.2. <i>Lactacaseibacillus rhamnosus</i> e seu potencial probiótico.....	19
3.3. Prebióticos.....	20
3.3.1. Pectina.....	21
3.4. Microbiota intestinal e alimentos funcionais.....	24
3.5. Alimentos probióticos em matrizes vegetais.....	26
<b>4. MATERIAL E MÉTODOS.....</b>	<b>29</b>
4.1. <i>Lactacaseibacillus rhamnosus</i> ATCC 7469: Preservação e Reativação.....	29
4.2. Maracujá da Caatinga.....	29
4.2.1. Obtenção da polpa do maracujá.....	29
4.2.2. Obtenção da farinha da casca do maracujá.....	30
4.2.3. Extração de pectina a farinha da casca.....	30
4.3. Produção das bebidas probióticas.....	32
4.3.1. Meio de Cultura.....	32
4.3.2. Produção de bebidas probióticas fermentadas e planejamento fatorial.....	32
4.4. Resistência de <i>Lactacaseibacillus rhamnosus</i> ATCC 7469 às condições de simulação gastrointestinal.....	34
4.5. Métodos analíticos.....	35
4.5.1. Determinação do pH.....	35
4.5.2. Determinação da umidade.....	35
4.5.3. Determinação da viabilidade celular.....	35
4.5.4. Determinação da concentração de ácido láctico.....	35
4.5.5. Determinação dos açúcares redutores totais.....	35
4.5.6. Determinação dos compostos fenólicos totais.....	36
4.6. Análises do planejamento.....	36
<b>5. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....</b>	<b>37</b>
5.1. Rendimento da pectina extraída da farinha da casca do maracujá.....	37

5.2. Bebidas após fermentação.....	39
5.3. Influência das concentrações da polpa e da pectina sobre a viabilidade durante o estoque.....	45
5.4. Parâmetros físico-químicos: efeitos das concentrações da polpa e da pectina....	49
5.5. Influência das concentrações de polpa e pectina na sobrevivência de <i>Lactobacillus rhamnosus</i> ATCC 7469 na simulação das condições gastrointestinais.....	54
6. CONCLUSÕES.....	58
REFERÊNCIAS.....	60

## 1. INTRODUÇÃO

Estudos demonstram que o bem-estar humano está intimamente relacionado com o tipo de dieta e estilo de vida de cada indivíduo (CRUZ *et al.*, 2007). Dessa forma, o interesse por produtos alimentícios saudáveis, nutritivos e de grande aproveitamento tem aumentado consideravelmente, o que resulta em diversos estudos sobre probióticos (MISHRA *et al.*, 2021). Os probióticos são microrganismos vivos que, quando administrados em quantidade adequada, conferem uma série de benefícios à saúde, incluindo controle de infecções intestinais, estimulação da motilidade intestinal e melhor absorção de nutrientes (SAAD, 2006; ASHAOLU, 2020). A propósito, atualmente, com a pandemia do COVID-19, a ação dos probióticos no sistema imunológico e respiratório tem sido o foco de muitas pesquisas (KHALED, 2021; DI PIERRO, 2020; TRINCHIERI *et al.*, 2022).

Para um microrganismo ser considerado probiótico, deve ser um habitante normal do trato gastrointestinal, não ser patogênico, sobreviver à passagem através do estômago, e manter sua viabilidade e atividade metabólica no intestino (ANVISA, 2020; HYUN & SHIN, 1998; COLLADO *et al.*, 2009; CARICILLI & SAAD, 2013). No caso de formulações alimentares, esses microrganismos, majoritariamente, são incorporados em produtos à base de leite, sendo este um fator limitante, visto que 60% a 70% da população brasileira apresenta algum nível de intolerância a produtos lácteos (BEVILACQUA *et al.*, 2013; MISHRA *et al.*, 2021; INSTITUTO NOA, 2017). Bebidas à base da polpa de frutas representam uma alternativa para esta população por serem nutricionalmente ricas, constituindo um veículo ideal para culturas probióticas (MIN *et al.*, 2019). A linhagem de *Lacticaseibacillus rhamnosus* ATCC 7469 tem sido relatada por adequar-se bem a matrizes de polpas de frutas (SANTOS *et al.*, 2017; ANDRADE *et al.*, 2019).

O maracujá da Caatinga (*Passiflora cincinnata* Mast.) é um exemplo de fruta que pode servir como veículo para esses probióticos. Também chamado de maracujá do mato, o maracujá da Caatinga é uma espécie que é rica em minerais e vitaminas, principalmente vitamina C, compostos bioativos, fibras e possui um potencial para alimento funcional (SANTOS *et al.*, 2021). Na casca do maracujá da Caatinga pode ser encontrado um polissacarídeo natural complexo chamado de pectina, o qual aumenta o valor nutricional do fruto devido às suas características e estrutura química, possuindo ação prebiótica (MENDES *et al.*, 2021). Os prebióticos são polímeros que atuam modulando a atividade e composição microbiana do intestino, gerando benefícios ao organismo humano (ROBERFROID *et al.*, 2010). Alguns estudos alegam que sua presença em conjunto com probióticos, auxilia na manutenção da

viabilidade celular durante período de armazenamento e passagem pelo trato gastrointestinal, sendo um ingrediente interessante na formulação de alimentos funcionais (IRAPORDA *et al.*, 2019; VALERO-CASES & FRUTOS, 2017; LARSEN *et al.*, 2018). A ação sinérgica de probiótico e prebiótico configura um simbiótico (CENCIC & CHINGWARU, 2010).

A utilização de polpas de frutas como matrizes para inserção de probióticos enfrenta diversos desafios, sendo a viabilidade desses microrganismos dependente de alguns fatores, como tipo de linhagem, pH e substâncias no meio de cultura (LILLO-PÉREZ *et al.*, 2021). Identificar fatores que possam auxiliar na manutenção da viabilidade dos probióticos nessas matrizes vegetais durante armazenamento e passagem pelo trato gastrointestinal é de grande importância para garantir a eficácia desses alimentos funcionais e prolongar o tempo de prateleira. Além disso, a utilização de resíduos vegetais, como cascas de frutas, para gerar produto de valor agregado é uma ótima alternativa de minimizar o descarte incorreto desses materiais. Dessa forma, o presente estudo teve como objetivo verificar os efeitos das concentrações da polpa e da pectina do maracujá da Caatinga na produção da bebida simbiótica, observando aspectos físico-químicos e a sobrevivência do probiótico *L. rhamnosus* ATCC 7469 durante estoque refrigerado e simulação gastrointestinal.



## **2. OBJETIVOS**

### **2.1. Objetivo geral**

Verificar a influência das concentrações da polpa e da pectina do maracujá da Caatinga (*Passiflora cincinnata* Mast.) na produção da bebida simbiótica, observando aspectos físico-químicos e a sobrevivência do probiótico *L. rhamnosus* ATCC 7469 durante estoque refrigerado e simulação gastrointestinal.

### **2.2. Objetivos específicos**

- Obter a farinha das cascas do maracujá da Caatinga;
- Determinar umidade das cascas e da farinha do maracujá;
- Extrair a pectina da farinha das cascas do maracujá;
- Determinar o rendimento gravimétrico da extração da pectina;
- Produzir bebidas fermentadas utilizando diferentes concentrações da polpa do maracujá;
- Analisar pH, viabilidade, compostos fenólicos, metabólitos e concentrações de açúcares durante processo fermentativo;
- Elaborar, a partir das bebidas fermentadas, bebidas simbióticas pela adição de diferentes quantidades da pectina extraída;
- Verificar a influência das diferentes concentrações de polpa e pectina sobre a sobrevivência do probiótico durante estoque refrigerado, através do planejamento fatorial;
- Analisar o pH, as concentrações dos ácidos cítrico e lático e dos açúcares redutores totais nas bebidas simbióticas durante estoque refrigerado;
- Verificar sobrevivência do microrganismo após simulação gastrointestinal das bebidas.

### 3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

#### 3.1. Maracujá da Caatinga e suas propriedades

O maracujá pertence à família *Passifloraceae* e é amplamente cultivado nas regiões dos trópicos e regiões temperadas, sendo o Brasil um dos territórios que apresentam um maior número de espécies (FALEIRO *et al.*, 2011; PEREIRA *et al.*, 2015). O país é o principal produtor e consumidor do maracujá do mundo, sendo 90% da produção nacional de maracujá amarelo (SANTOS *et al.*, 2021). No entanto, no quesito sensorial e nutricional, outras espécies têm se destacado e se mostrado promissoras na área comercial, como é o caso do maracujá da Caatinga (*P. cincinnata* Mast.) (Figura 1). Essa espécie é conhecida por ser uma fruta rica em minerais e vitaminas, principalmente vitamina C, é muito utilizada na fabricação de sucos devido ao sabor característico e destaca-se por apresentar alta tolerância a estresse hídrico e um ciclo longo de produção (EMBRAPA, 2016; JESUS *et al.*, 2017; ARAÚJO *et al.*, 2019). Santos *et al* (2017) observaram que em 100g de polpa do fruto continha 52% de ácido ascórbico, 3,83% de lipídeos, 0,84% de proteínas e o açúcar dominante era a frutose com 1,79%.

O fruto possui maior ocorrência na região semiárida do Nordeste brasileiro, sendo relatada sua distribuição por estados como Pernambuco, Bahia, Ceará e Goiás (ARAÚJO *et al.*, 2008; LIMA & CUNHA, 2004). A agricultura familiar faz uso da espécie para gerar renda, porém em algumas áreas semiáridas o fruto encontra-se escasso ou destinado ao desaparecimento (ARAÚJO & FALEIRO, 2020). Para suprimir esses problemas, sistemas alternativos de cultivo podem auxiliar nessas áreas com limitação de água e ajudar os agricultores locais a manter o comércio ativo. O cruzamento entre populações da espécie foi utilizado para gerar uma nova cultivar híbrida, a BRS sertão forte (BRS SF), que suporta um maior estresse hídrico e possui maior qualidade (RINALDI *et al.*, 2022). Além disso, o cultivo de BRS SF gera um maior rendimento de frutos (ARAÚJO *et al.*, 2019). Na Bahia, por exemplo, a produtividade média do fruto é de 17 toneladas hectare/cultura, podendo chegar a 30 toneladas por hectare (SANTOS *et al.*, 2021). As estratégias de agregação de valor é um exemplo de ação que fortalece a base econômica da agricultura familiar (ARAÚJO & FALEIRO, 2020). Dessa forma, a transformação da polpa, da casca ou das sementes do maracujá do mato em produtos como sucos, geleias, suplementos, sorvetes e licores são de grande relevância para melhorar a vida de agricultores locais.

Por ser um fruto rico em nutrientes, tanto na polpa quanto na casca, os frutos do gênero *Passiflora* apresentam muitos efeitos terapêuticos, como ter ação cicatrizante, anticonvulsivante, anti-inflamatória e ansiolítica (COQUEIRO *et al.*, 2016). Além disso,

alguns estudos têm mostrado potenciais benefícios à saúde devido às suas propriedades antibióticas, anti-hipertensiva e sedativa (SIEBRA *et al.*, 2018; SOUZA *et al.*, 2014). Em sua casca há a presença de polissacarídeos complexos, como a pectina, que possuem diversas propriedades, como já relatado anteriormente. A pectina pode ser extraída e utilizada de diversas formas, não podendo ser classificada mais como resíduo industrial (CÓRDOVA *et al.*, 2005). Tendo isso em vista, a exploração voltada para a extração da pectina da casca de frutas tropicais, como o maracujá do mato, tem sido relatada em alguns estudos (SANTOS *et al.*, 2017; MENDES *et al.*, 2021).

**Figura 1** – Fruto do Maracujá da Caatinga BRS SF (*Passiflora cincinnata* Mast.).



Fonte: Autora (2022).

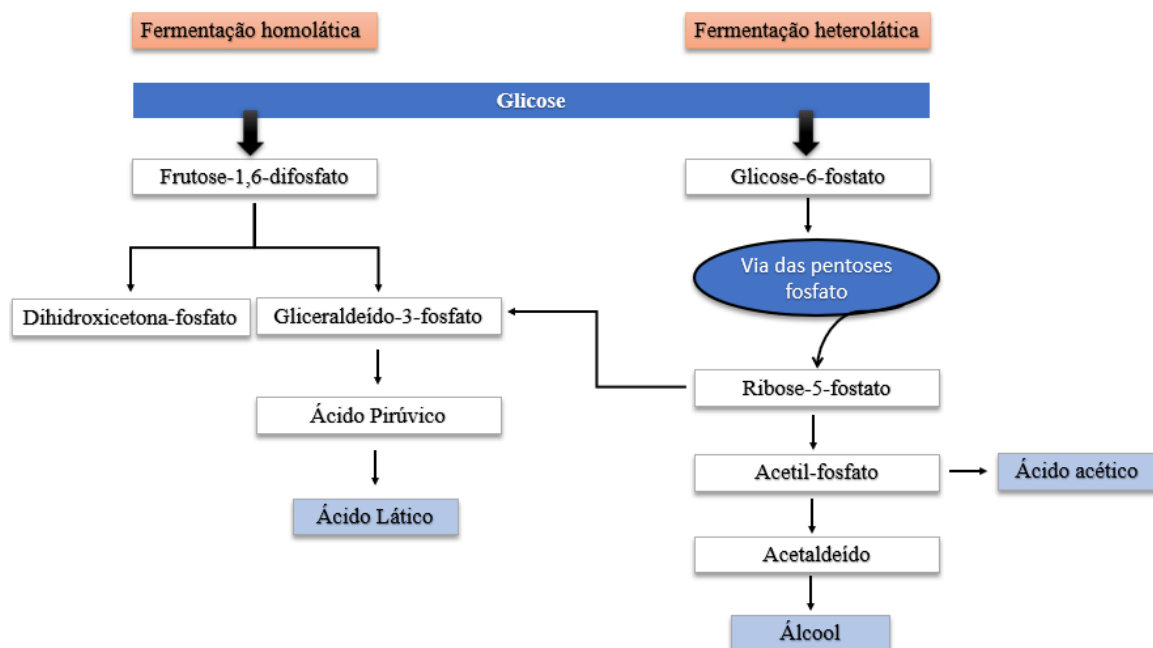
No albedo, parte branca da casca do maracujá, é onde se encontra a pectina e outras substâncias como niacina, ferro e cálcio. A niacina auxilia na produção de hormônios e os minerais atuam na prevenção de doenças como anemia e no fortalecimento de ossos. A farinha obtida da tamisação da casca do maracujá da Caatinga pode apresentar cerca de 55% de pectina em sua composição, semelhante ao do maracujá amarelo, podendo se tornar uma fonte comercial de pectina (SANTOS *et al.*, 2017; MENDES *et al.*, 2021). Em alguns estudos, outros frutos apresentaram um rendimento inferior em comparação ao apresentado pelo maracujá da Caatinga, como em Romã (23,87%), uva (32,3%) e toranja (26,74%) (MOORTHY *et al.*, 2015; MINJARES-FUENTES *et al.*, 2014; XU *et al.*, 2014). Visto isso, é perceptível o potencial deste fruto no desenvolvimento de alimentos, sendo interessante a sua incorporação em produtos probióticos.

### 3.2. *Lactobacillus rhamnosus* e seu potencial probiótico

Os probióticos são microrganismos vivos que quando administrados em quantidades adequadas conferem benefícios à saúde. O conhecimento acerca dos benefícios causados pela ingestão de probióticos é bastante difundido. A utilização desses microrganismos na prevenção de algumas doenças, como a COVID-19, tem sido cada vez mais estudado (SINGH & RAO, 2021; BOTTARI, CATELLONI e NEVIANI, 2021; KURIAN *et al.*, 2021). Pham *et al.* (2021) observaram em estudo utilizando camundongos, que a ingestão de *L. rhamnosus* EH8 e micélio contribuiu na redução de secreção pulmonar ocasionada pelo vírus SARS-CoV-2.

Bactérias do gênero *Lactobacillus* são bastante utilizadas em formulações probióticas, devido à capacidade de fermentação e aos benefícios à saúde associados (TACHEDJIAN *et al.*, 2017). São bactérias de características ácido lácticas, Gram-positivas, de morfologia bacilar e anaeróbias aero tolerantes (BERNARDEU *et al.*, 2008). Segundo Wang *et al.* (2021), *Lactobacillus* possui um metabolismo homofermentativo (ou homolático), gerando como produto da fermentação apenas ácido láctico (Figura 2). No processo fermentativo onde se é gerado apenas ácido láctico, as bactérias fazem uso da glicose disponível no meio, como fonte de carbono, produzem piruvato por meio da glicólise que, posteriormente, é convertido em ácido láctico pela ação da lactato desidrogenase (WANG *et al.*, 2021).

**Figura 2** – Esquema da fermentação homolática e heterolática.



Fonte: Autora (2022).

Várias espécies de *Lactobacillus* são conhecidas por suas propriedades probióticas, um exemplo é *Lactobacillus rhamnosus*, um dos microrganismos mais utilizados nas formulações alimentares funcionais em virtude de seu potencial em promover à saúde do hospedeiro (MINJ *et al.*, 2020; HOJSAK *et al.*, 2010; JORJÃO *et al.*, 2015; VANDENPLAS *et al.*, 2015). Alguns autores descrevem *L. rhamnosus* como uma espécie heterofermentativa (ou heterolática) facultativa, ou seja, dependendo da condição proposta é capaz de gerar mais de um produto na fermentação, não apenas ácido lático, mas também etanol, ácido acético e CO<sub>2</sub> (COSTA, 2006, BURITI & SAAD, 2007; MADIGAN *et al.*, 2010; FONSECA *et al.*, 2021) (Figura 2).

É relatado em artigos que *L. rhamnosus* tem um potencial em combater infecções por *Escherichia coli*, modular ou estimular a resposta imune por macrófagos, tratar gastroenterite pediátrica e prevenir infecções no trato respiratório, e gastrointestinal (HOJSAK *et al.*, 2010; JORJÃO *et al.*, 2015; VANDENPLAS *et al.*, 2015). Montorsi *et al.* (2016) relatam a eficácia na utilização de *L. rhamnosus* em conjunto com vitamina C no tratamento de infecção urinária em mulheres, as quais apresentaram ausência de sintomas após uso do suplemento. Essa espécie pode reduzir o número de bactérias patogênicas, produzir compostos bioativos, além de facilmente aderir-se à membrana das células epiteliais intestinais, promovendo um aumento da resposta imune (MINJ *et al.*, 2020).

A aplicabilidade desses microrganismos em alimentos não lácteos é bastante difundida, sendo um bom exemplo a linhagem *L. rhamnosus* ATCC 7469, a qual é encontrada na formulação de bebidas fermentadas (FARIAS *et al.* 2016; NEMATOLLAHI *et al.*, 2016; SANTOS *et al.*, 2017; ANDRADE *et al.*, 2019). A fim de potencializar viabilidade desses probióticos, prolongar tempo de prateleira e garantir eficácia, a junção de microrganismos probióticos a ingredientes prebióticos tem se mostrado no foco de muitos estudos para otimizar a formulação de alguns alimentos funcionais, surgindo a partir disso os alimentos simbióticos.

### 3.3. Prebióticos

Os prebióticos são moléculas complexas que atuam modulando a atividade e composição microbiana do intestino, gerando benefícios ao organismo humano (ROBERFROID *et al.*, 2010). Essa modulação ocorre porque essas substâncias poliméricas servem de fonte de energia para microbiota do cólon e ao serem degradadas liberam ácidos graxos de cadeia curta (AGCC) no meio. Essa liberação ocasiona uma alteração no pH intestinal e, por consequência, prejudica a permanência de microrganismos sensíveis ao meio ácido e

favorece a sobrevivência de bactérias benéficas produtoras de ácidos orgânicos (DAVANI-DAVARI *et al.*, 2019). Dessa forma, o prebiótico ideal é aquele que resiste aos estresses do trato gastrointestinal, que não é absorvido durante passagem por estômago e intestino e que é facilmente degradado pela microbiota intestinal benéfica (MISHRA *et al.*, 2018).

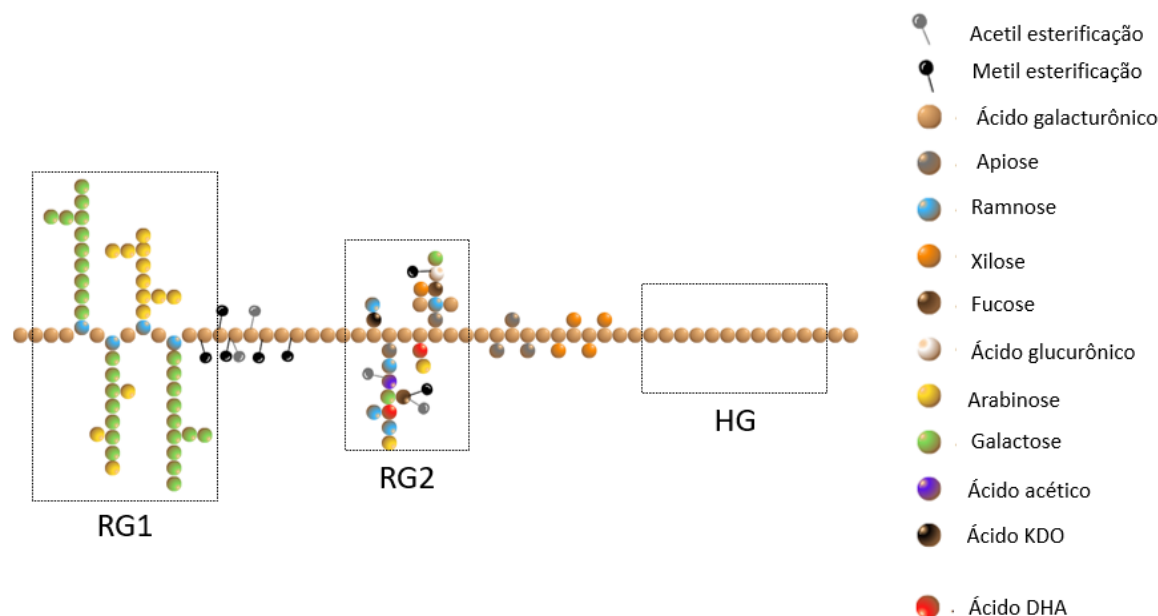
O tipo de produto gerado a partir da fermentação dos prebióticos vai depender da estrutura da molécula e da composição microbiana intestinal (DAVANI-DAVARI *et al.*, 2019). Existem bactérias que conseguem degradar uma ampla quantidade de carboidratos e existem bactérias mais restritas, as quais conseguem quebrar substratos particulares, consideradas espécies-chave. As bifidobactérias conseguem metabolizar mais facilmente carboidratos de baixo peso molecular, em contrapartida, os de alto peso molecular são mais facilmente degradados por membros do gênero *Bacteroides* (SANDERS *et al.*, 2019). Dessa forma, a ação prebiótica pode trazer efeitos diferentes para o organismo humano, podendo trazer melhorias na função intestinal, no sistema imunológico, na regulação do apetite, entre outros (CUNNINGHAM *et al.*, 2021).

Existem variados tipos de prebióticos, como frutooligossacarídeos (FOS), galactooligossacarídeos (GOS) e frutanos. Esse último são os polímeros de frutose, sintetizados em vegetais, que atuam como reserva de carbono para as plantas. A pectina, polissacarídeo encontrado em boa parte das frutas, se encaixa nesse grupo, possui uma estrutura complexa e é bastante utilizada nas indústrias farmacêuticas e alimentícias (RODRIGUES *et al.*, 2015). Essa ampla atuação da pectina nas indústrias se deve, não apenas a sua ação prebiótica, mas também por conta de outras propriedades que são fornecidas por essa molécula, como por exemplo o seu poder de geleificação.

### 3.3.1. Pectina

A pectina é um carboidrato não digerível encontrado na parede celular de frutos e vegetais, possui uma estrutura complexa e que, devido a isso, enzimas do corpo humano não conseguem metabolizar (CANTERI *et al.*, 2012). Em contrapartida, algumas bactérias que estão presentes no cólon possuem enzimas específicas que auxiliam na degradação dessas moléculas. A pectina é um frutano que possui mais de 20 tipos de ligações químicas diferentes em sua estrutura e que apresenta como principal característica uma composição com cerca 65% de ácido galacturônico (CHRISTIAENS *et al.*, 2016; TIAN *et al.*, 2017; ROPARTZ & RALET, 2020; LIANG *et al.*, 2020). Na estrutura pectinolítica é possível identificar três tipos distintos de regiões: (1) região homogalacturonana (HG), (2) região ramnogalacturonan 1 (RG1) e (3) região ramnogalacturonan 2 (RG2) (Figura 3) (CHEN *et al.*, 2015).

**Figura 3** – Esquema da estrutura da pectina demonstrando os três domínios: HG (homogalacturonana), RG1 (Ramnogalacturonana 1) e RG2 (Ramnogalacturonana 2).



Fonte: Autora (2022).

A parte HG é uma região homopolímera, composta por moléculas de ácido D-galacturônico (D-GalA) unidas por ligações  $\alpha$ -(1  $\rightarrow$  4), que tornam a estrutura linear. Essa região é principal constituinte da pectina e pode conter esterificações, sendo carboxilas metilesterificadas ou acetiladas. A região RG1 representa cerca de 35% da pectina, possui uma alta quantidade de ramificações e a cadeia principal é composta por dissacarídeos repetidos D-GalA e L-ramnose [ $\rightarrow$  4- $\alpha$ -D-GalA- (1  $\rightarrow$  2) - $\alpha$ -L-Ram-(1  $\rightarrow$ )]<sub>n</sub> (ALBA & KONTOGIORGOS, 2017). No domínio RG1, por conter moléculas diferentes, há uma perda na linearidade da cadeia principal e as ramificações podem variar em tamanho e composição de açúcares (TIAN *et al.*, 2017). A RG2, por sua vez, equivale a 10% da pectina e é a região mais conservada, contendo no máximo nove resíduos de D-GalA e cadeias de resíduos laterais traseiras com até 12 tipos diferentes de açúcares (CHRISTIAENS *et al.*, 2016).

As pectinas podem apresentar algumas diferenças estruturais a depender da fonte de onde são extraídas e a funcionalidade desses polímeros pode diferenciar dependendo da quantidade de esterificações que a molécula possua (CHRISTIAENS *et al.*, 2016; ALBA *et al.*, 2019). Dessa forma, de acordo com o grau de esterificação (GE), que representa a porcentagem de metoxilas na molécula, as pectinas podem ser classificadas em: de alto GE (grau de

esterificação acima de 50%) e de baixo GE (grau de esterificação abaixo de 50%). Geralmente, o que diferencia uma pectina de outra é a composição de seus açúcares, comprimento da cadeia e grau de esterificação. As pectinas que têm uma quantidade menor de esterificações são mais rapidamente fermentadas, estimulando o crescimento seletivo de linhagens probióticas, por isso são bastante requeridas nas formulações de alimentos funcionais (PAYLING *et al.*, 2020).

O teor desses polissacarídeos pécticos pode ser superior a 15%, em peso seco, em alguns produtos agrícolas, como polpa de beterraba, polpa de tomate, casca de banana, bagaço de maçã, casca de maracujá, casca de manga e albedo cítrico (SANTOS *et al.*, 2017; GRASSINO *et al.*, 2016; SEIXAS *et al.*, 2014; WANG *et al.*, 2016; OLIVEIRA *et al.*, 2016; ALMOHAMMED *et al.*, 2017; DRANCA, 2019; CANTERI *et al.*, 2012). Porém, é importante ressaltar, que mesmo com uma boa quantidade péctica em conteúdo nutricional, nem todo produto vegetal pode ser fonte comercial, pois as propriedades podem diferir entre os frutos. Tendo isso em vista, é importante analisar não apenas o teor péctico presente nesses vegetais, mas também as propriedades oferecidas pela pectina extraída e as propriedades requeridas por quem a extrai. Existem metodologias de extração que garantem um bom rendimento de pectina, sendo já observado um rendimento de 55% após extração em casca do maracujá da Caatinga (SANTOS *et al.*, 2017).

A aplicação da pectina é bastante ampla, visto que é abundante e de baixo custo, sendo vastamente utilizada na formulação de alimentos como sucos probióticos, iogurtes e geleias, devido às propriedades geleificantes (SANTOS *et al.*, 2017; ESPÍRITO-SANTO, 2013). Seu efeito prebiótico vem sendo destacado em vários estudos, pois potencializa o efeito probiótico das bactérias que estão no cólon, melhorando, por exemplo, a adesão desses microrganismos à mucosa intestinal (TARIFA *et al.*, 2021). Alguns estudos alegam que sua presença em conjunto com probióticos, auxilia na manutenção da viabilidade celular durante estoque e passagem pelo trato gastrointestinal, isso porque existem pectinas com propriedades emulsificantes e geleificantes que auxiliam na estabilidade intracelular (GEREZ *et al.*, 2012; LARSEN *et al.*, 2018; ZHANG *et al.*, 2016).

As metodologias utilizadas para verificar os efeitos positivos em microrganismos na presença de pectina são variadas, podendo ser por suplementação péctica em meios de cultura apropriados, análise das fezes de indivíduos que consomem o prebiótico, simulação gastrointestinal para analisar produção de AGCC ou análise de meios fermentados contendo pectina, através de CLAE (MÍGUEZ *et al.*, 2020). Em estudos *in vitro* foram visualizados efeitos positivos da presença de pectina, estimulando gêneros como *Lactobacillus*, melhorando a viabilidade em meios com pH ácidos, principalmente *L. rhamnosus*, seja por encapsulamento



ou juntos em solução (GEREZ *et al.*, 2012; PRANDI *et al.*, 2018; SANTOS *et al.*, 2017). Segundo Chotiko & Sathivel (2016), a pectina pode atuar retardando a penetração de fluidos na célula, através da formação de hidrogel, e servir como barreira de proteção para as células bacterianas.

Além da ação prebiótica, a pectina já foi relatada atuando na diminuição de colesterol e promovendo saciedade, sendo um fator interessante para sua introdução em alimentos funcionais, junto aos probióticos (ESPINAL-RUIZ *et al.*, 2016; LI *et al.*, 2014). No entanto, são requeridos mais estudos sobre sua estrutura e sobre os microrganismos que possam degradá-la. A análise genômica para identificar possíveis genes que são ativados, quando na presença de pectina, e que expressam enzimas degradadoras do biopolímero é de grande importância. O entendimento e melhor formulação dos produtos alimentícios é, também, de grande relevância, visto que não se quer a quebra desses prebióticos durante estoque, já que promovem mudanças nas características sensoriais, e sim proteção contra possíveis estresses e manutenção da viabilidade (FILHO *et al.*, 2019; TERPOU *et al.*, 2019; BARBOSA *et al.*, 2016).

### **3.4. Microbiota intestinal e alimentos funcionais**

Os microrganismos estão presentes em praticamente todos os ambientes e existem vários tipos de consórcios microbianos, sendo um deles o que está presente no intestino humano. A microbiota gastrointestinal inclui uma densa quantidade de microrganismos, ocorrendo uma predominância de bactérias. Essa colonização do cólon se dá a partir do nascimento de um indivíduo, e variáveis, como alimentação e estilo de vida, influenciam na composição e atividade da microbiota (GOMES, 2020). Cada indivíduo possui uma microbiota única, a qual pode ser modificada e otimizada quando há um favorecimento de espécies benéficas (LOPEZ-LEGARREA, 2014).

A microbiota intestinal permite que o hospedeiro se beneficie do metabolismo bacteriano através dos metabólitos formados (PAYLING *et al.*, 2020). Dessa forma, esses organismos que vivem no intestino, utilizam os componentes presentes na dieta do indivíduo, como carboidratos complexos, e fermentam, liberando produtos que modulam a saúde e funcionalidade da microbiota existente (FLINT *et al.*, 2017). No interior do cólon, um microrganismo faz uso do resíduo gerado por um outro organismo, ocorrendo o que se chama de alimentação cruzada, ao qual mantém esse consórcio microbiano funcionando (SMITH *et al.*, 2019). Dependendo do tipo de microrganismo e da alimentação do hospedeiro, essa rede de interação cruzada pode trazer inúmeros benefícios, favorecendo a saúde e bem-estar do ser humano.

A maior fração de compostos da dieta que chegam ao cólon para serem fermentados são os carboidratos. Carboidratos complexos, como os frutanos, podem sofrer fermentação e gerar ácidos graxos de cadeia curta, os quais podem ser absorvidos pela mucosa do hospedeiro trazendo muitos benefícios ao intestino. É importante frisar que, o entendimento sobre a ecologia da microbiota intestinal é limitado, no entanto, sabe-se que a dieta alimentar está diretamente relacionada com os microrganismos que compõem esse ambiente (PAYLING *et al.*, 2020). Quando há uma otimização dessa microbiota, há, por exemplo, a formação de um escudo contra os patógenos e um melhoramento no sistema imunológico.

Os alimentos funcionais podem auxiliar nessa otimização. Eles são semelhantes aos alimentos convencionais, sendo consumidos como parte de uma dieta normal, no entanto, são conhecidos por melhorar a saúde do hospedeiro (GUL *et al.*, 2016). Os alimentos funcionais podem ser divididos em várias categorias, estando os alimentos suplementados com probióticos, ingredientes alimentares derivados, como prebióticos, e simbióticos (junção de prebiótico e probiótico) inseridos nessa classificação (MISHRA *et al.*, 2018). A preocupação por uma alimentação mais saudável vem sendo bastante frequente, aumentando a preferência dos consumidores por produtos ricos nutricionalmente e que auxiliem no combate às doenças e infecções (SILVA *et al.*, 2019).

A junção e ação sinérgica entre probióticos e prebióticos que proporcionam benefícios à saúde do hospedeiro configura um simbiótico (CENCIC & CHINGWARU, 2010). Para o desenvolvimento de um simbiótico é necessário: (1) selecionar o probiótico de acordo com a aplicação do simbiótico, (2) selecionar um resíduo vegetal e extrair a fibra com potencial prebiótico, (3) unir linhagem probiótica e fibras alimentares, (4) verificar sobrevivência e viabilidade de probióticos na formulação simbiótica, e (5) verificar se o produto atende aos padrões e se está pronto para ser comercializado (MISHRA *et al.*, 2021). De acordo como ocorre essa combinação, existem dois tipos de simbióticos: os complementares e os sinérgicos. O simbiótico complementar é aquele em que o probiótico e o prebiótico podem promover a saúde de maneira independente, onde o probiótico pode ou não utilizar o substrato disponível, e o simbiótico sinérgico, por sua vez, é quando o microrganismo e o substrato não fornecem benefícios individualmente, sendo necessário o consumo do prebiótico pelo probiótico utilizado (SWANSON *et al.*, 2020).

A suplementação com simbióticos pode ocorrer através da ingestão de alimentos ou cápsulas. Alguns microrganismos probióticos como Lactobacilos e Bifidobactérias são comumente utilizados em formulações simbióticas, enquanto alguns carboidratos complexos como frutooligossacarídeos (FOS), galactooligossacarídeos (GOS) e inulina são as principais

substâncias prebióticas utilizadas em simbióticos (KAZEMI *et al.*, 2021). Probióticos e prebióticos atuam principalmente na modulação da microbiota intestinal. No entanto, existem outros benefícios que podem ser fornecidos quando essa combinação é ingerida. O consumo de simbióticos e outras formas microbianas aumenta a taxa de secreção de IgA salivar, imunoglobulina que é responsável pela defesa imune nas membranas mucosas, que é útil para prever infecções do trato respiratório superior (KAZEMI *et al.*, 2021).

### 3.5. Alimentos probióticos em matrizes vegetais

Comumente as matrizes alimentares usadas para incorporar os probióticos são lácteas, como iogurtes, queijos e sorvetes (BEVILACQUA *et al.*, 2013). Esses produtos lácteos não são adequados para alguns grupos de consumidores, visto que cerca de 65% da população mundial possui problemas com intolerância à lactose e uma outra parte possui dietas restritas (MANTZOURANI *et al.*, 2019). Além disso, existem proteínas que possuem ação inflamatória no organismo humano que advém do leite bovino. O leite de vaca possui dois tipos de  $\beta$ -caseína, A1 e A2, e já foi relatado que a  $\beta$ -caseína A1 está associada ao aumento da inflamação gastrointestinal, fluxo intestinal atrasado e redução na precisão do processamento cognitivo (JIANQIN *et al.*, 2015). Diante desse contexto, um grupo de alimentos não lácteos vem ganhando espaço e se destacando na formulação de alimentos veganos e livres de alérgenos, os probióticos à base frutas, legumes e cereais (BAKR, 2015; COSTA *et al.*, 2013; MARTINS *et al.*, 2013).

O mercado mundial de bebidas vegetais tem crescido continuamente e tem-se estimado que até 2025 movimentará cerca de 36,7 milhões de dólares (MARKETS & MARKETS, 2020). Além disso, o uso de produtos probióticos de origem não láctea tem crescido desde 2013, atingindo 15% (ao ano) até o ano de 2018 (LILLO-PEREZ *et al.*, 2020). Esses veículos se destacam na formulação de alimentos funcionais, pois são ricos nutricionalmente, fonte de compostos antioxidantes e antitumorais, vitaminas e fibra alimentar. Além disso, fornecem produtos com baixo teor de colesterol, previnem e inibem a deterioração e o crescimento de patógenos (MIN *et al.*, 2019).

No entanto, a manutenção da viabilidade de probióticos em matrizes de sucos de frutas e vegetais é dependente de vários fatores, como tipo de linhagem, temperatura, nível de oxigênio, substâncias do meio de cultura e componentes antimicrobianos (LILLO-PEREZ *et al.*, 2021). Além disso, visto que boa parte dos probióticos são isolados de fontes lácteas, manter a viabilidade em matrizes diferentes é um desafio. As polpas e sucos de frutas apresentam disponibilidade de nutrientes diferentes, pH desfavorável e falta de capacidade tamponante

(RASIKA *et al.*, 2021; SHARMA *et al.*, 2021). O processamento para inserção na matriz vegetal também é um dos problemas enfrentados, além dos que já foram mencionados em tópicos anteriores, que podem afetar a sobrevivência e a viabilidade (TERPOU *et al.*, 2019). Todavia, diversos estudos relatam a capacidade de algumas matrizes vegetais de manter a viabilidade de probióticos, pelo conteúdo lipídico e nutrientes específicos da planta que podem proteger as células das condições gastrointestinais e outros estressores (ARIOLI *et al.*, 2018; PERJÉSSY *et al.*, 2021; LILLO-PEREZ *et al.*, 2021)

Para que uma base alimentar não láctea seja considerada um bom veículo, sua composição tem que ser capaz de manter uma boa viabilidade dos probióticos e favorecer seu crescimento (RANADHEERA *et al.*, 2010). O desenvolvimento e análise de bebidas probióticas em matrizes não lácteas tem sido foco de muitos estudos recentes, tendo sido relatado boa viabilidade em sucos de cenoura e laranja, bebidas de cereja com farelo de trigo, suco de laranja com hibisco e oligofrutose e bebidas de frutas vermelhas (VALERO-CASES & FRUTOS, 2017; IRANDA *et al.*, 2019; BERNAL-CASTRO *et al.*, 2019; MANTZOURANI *et al.*, 2020). Em bebida probiótica formulada a partir da jaca, por exemplo, foi observado um aumento de 6 Log UFC/mL para 8,2 Log UFC/mL de *L. casei* ATCC334 durante fermentação de 24h à 37°C (MUHIALDIN *et al.*, 2021).

Bactérias probióticas em matrizes de sucos vegetais podem atuar na biotransformação de polifenóis em compostos fenólicos que possuam maior acessibilidade e bioatividade durante o tempo fermentativo e melhorar a capacidade antioxidante (VALERO-CASES *et al.*, 2020). Li *et al.* (2019) verificaram que a fermentação com *L. plantarum* ATCC 14917 a 37°C durante 24 horas melhorou a capacidade antioxidante ao aumentar teores de quercetina e floretina, compostos fenólicos. Já foi relatado também que esse efeito antioxidante pode contribuir para um efeito prebiótico em bactérias comensais (VALERO-CASES *et al.*, 2017). Além disso, alguns desses compostos fenólicos pode ter ação antimicrobiana e prevenir a disbiose intestinal inibindo patógenos (CUEVA *et al.*, 2010).

A utilização de polpas de frutas tem sido considerada uma ótima alternativa, pois além de possuírem boas características sensoriais, possuem uma gama de elementos em sua composição que podem ser consumidos diariamente, sem a presença de alergênicos (RANADHEERA *et al.*, 2010; RIVERA-ESPINOZA & GALLARDONAVARRO, 2010). Natt & Katyal (2022) relataram uma boa aceitabilidade de uma bebida com 50% de polpa de goiaba e 15% de inóculo de *L. acidophilus*, e que apresentaram, após 5 semanas de estoque refrigerado, uma contagem de células dentro dos limites aceitáveis. Um outro estudo relatou que as concentrações de polpas de manga podem influenciar na aceitabilidade por consumidores,

sendo as com 50% (v/v) de polpa do fruto as que apresentaram melhores resultados sensoriais (MWANZIA *et al.*, 2022). O processo fermentativo em frutas e vegetais melhora sua qualidade organoléptica e nutricional e retém os nutrientes e pigmentos coloridos, como mencionado anteriormente na geração de compostos fenólicos mais acessíveis (CASTRO *et al.*, 2019). Esses alimentos destacam-se pelas características sensoriais atrativas e tem gerado boa aceitação por diversos consumidores.

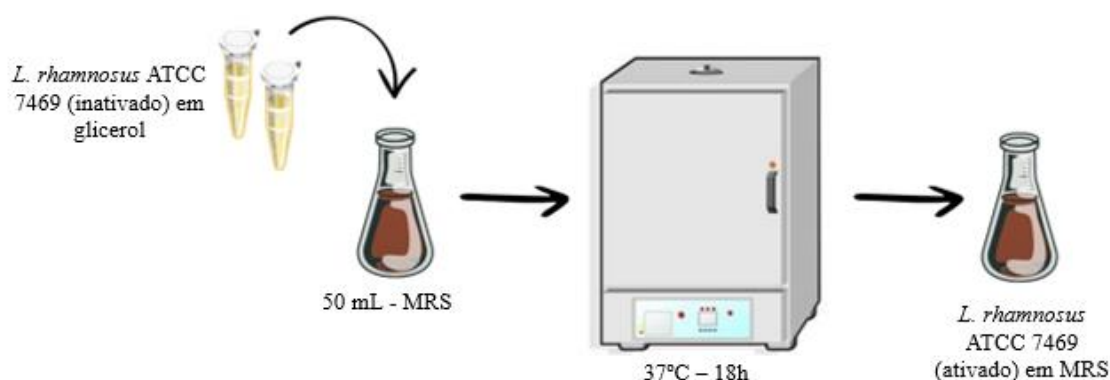
Além disso, é importante destacar que oferecer um destino alternativo para determinadas partes de frutas, as quais são consideradas resíduos pelas indústrias, é de grande valia diante dos diversos impactos ambientais gerados pelo mal descarte dos resíduos sólidos orgânicos. As indústrias de processamento de hortaliças e frutas que produzem sucos e polpas são as que mais geram esse tipo de material com alto potencial bioativo e as que mais são utilizadas como fonte de substâncias prebióticas, pois há uma grande quantidade gerada e os custos para obtenção são mínimos (MISHRA *et al.*, 2021). O reaproveitamento desse material rejeitado e o desenvolvimento de tecnologias que visam agregar valor ao mesmo geram retorno financeiro para o produtor, geração de emprego e um desenvolvimento econômico sustentável (CHAVAN *et al.*, 2018).

## 4. MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1. *Lactocaseibacillus rhamnosus* ATCC 7469: Preservação e Reativação

A linhagem probiótica de *L. rhamnosus* ATCC 7469, adquirida da American Type Culture Collection (ATCC, USA) manteve-se preservada em glicerol a 10 % (v/v) a -20°C (LIEW *et al*, 2005; CHANG E LIEW, 2013). Para a reativação do microrganismo, um volume de 2 mL da suspensão, mantida em glicerol a -20°C, foi inoculado em 50 mL de caldo MRS (de Man, Rogosa e Sharpe) em frasco de Erlenmeyer e, posteriormente, a cultura foi incubada a 37 °C por 18 horas (Figura 4).

**Figura 4** – Esquema do processo para reativação de *Lactocaseibacillus rhamnosus* ATCC 7469 em caldo MRS a 37°C por 18 horas.



Fonte: Autora (2022).

### 4.2. Maracujá da Caatinga

O maracujá da Caatinga (*P. cininnata* Mast.) BRS SF foi obtido por doação da Embrapa Semiárido. Os frutos foram colhidos no Campo Experimental da Caatinga, pertencente a Embrapa Semiárido e localizado em Petrolina (PE). O envio foi realizado um dia após a coleta e esperou-se em torno de uma semana para que os frutos alcançassem o estágio intermediário de maturação. Após isso, foram higienizados e lavados com água corrente e sabão líquido, para que, em seguida, a polpa e a casca pudessem ser utilizadas.

#### 4.2.1. Obtenção da polpa do maracujá

A extração de polpa dos maracujás foi feita por meio de uma faca de aço inoxidável para cortar o fruto e de uma peneira para separar as sementes. As polpas foram homogeneizadas,

acondicionadas em frascos de vidro anteriormente esterilizados e conservadas em freezer à - 20°C.

#### 4.2.2. Obtenção da farinha da casca do maracujá

A obtenção da farinha da casca do maracujá da Caatinga foi realizada de acordo com o procedimento utilizado por Santos *et al.* (2016). Após a remoção da polpa, as cascas foram cortadas em pequenos pedaços (Figura 5a), foi verificada a umidade, e posteriormente secas em estufa (NT514, Novatecnica) a 55 °C overnight. As cascas secas (Figura 5b) foram trituradas e tamisadas em moinho de faca (Marconi) (Figura 5c) no Instituto Agrônomo de Pernambuco (IPA). A farinha obtida (Figura 5d) foi devidamente embalada e armazenada em geladeira (4 ± 1 °C) até a utilização.

**Figura 5** – Esquema da obtenção da farinha da casca do maracujá.



Fonte: Autora (2022).

O rendimento de farinha a partir das cascas secas do maracujá da Caatinga foi obtido através da Equação 1, onde Y representa o rendimento de farinha, MF representa a massa da farinha da casca (em gramas) e MC a massa da casca seca (em gramas).

$$Y = \left( \frac{MF}{MC} \right) \quad (\text{Eq. 1})$$

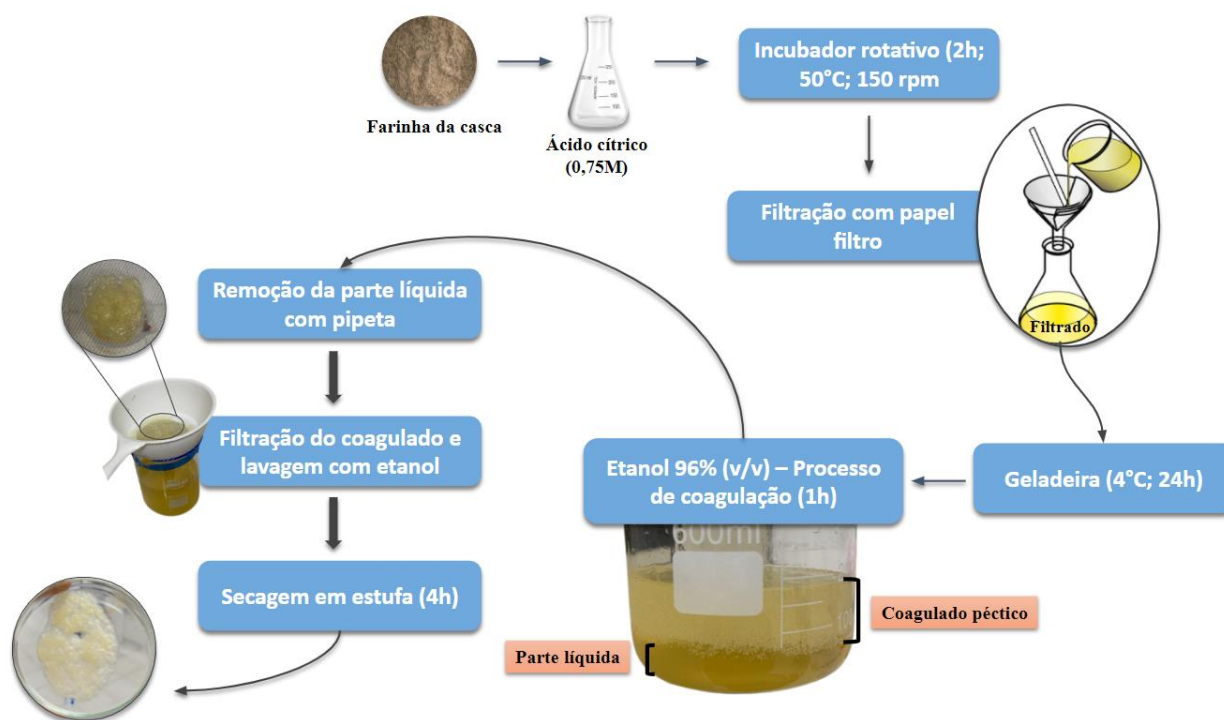
#### 4.2.3. Extração da pectina da farinha da casca

A pectina foi extraída da farinha da casca do maracujá, segundo metodologia proposta por Santos *et al.* (2016). Foram pesadas 2,5g da farinha da casca do fruto em um Erlenmeyer de 250 mL e nele foram adicionados 125 mL de ácido cítrico a 0,75 M. Em seguida, o frasco

foi colocado em um incubador rotativo (TE-422, Tecnal) a 50 °C e 150 rpm, durante 2 horas. Foi realizada uma filtração da suspensão utilizando-se papel de filtro qualitativo. Posteriormente, o filtrado foi acondicionado em geladeira (4 ± 1 ° C) durante 24 horas. Após este período, o filtrado foi submetido a um processo de coagulação durante 1 hora, pela adição de etanol a 96 % (v/v).

Para que não houvesse perdas do material coagulado no momento da filtração, foi retirada a maior parte líquida com auxílio de uma pipeta graduada e o material obtido pela coagulação foi filtrado em peneira com furos de diâmetro de 1 mm e, em seguida, lavado em três etapas. A lavagem inicial foi com 15 mL de etanol 70 % (v/v) e 0,5 % (v/v) de HCl, em seguida com 15 mL de etanol a 70 % (v/v) para neutralizar o pH e, por fim, com 15 mL de etanol a 96 % (v/v). O material resultante foi submetido ao processo de secagem em estufa (NT514, Novatecnica) a 50 °C por 4 horas. O esquema da etapa de extração da pectina pode ser visualizado na Figura 6.

**Figura 6** – Esquema da extração da pectina da farinha da casca do maracujá.



Fonte: Autora (2022).

O rendimento gravimétrico da pectina extraída da farinha do maracujá (Y) foi determinado de acordo com a Equação 2, onde MP é a massa seca de pectina (em gramas) e MF a massa seca da farinha da casca do maracujá (em gramas).



$$Y = \left( \frac{MP}{MF} \right) \quad (\text{Eq. 2})$$

### 4.3. Produção das bebidas probióticas

#### 4.3.1. Meio de cultura

O meio de cultura foi preparado pela diluição da polpa do maracujá da Caatinga, utilizando-se água destilada. Foram preparados três meios de cultura diferindo apenas na concentração da polpa: 20, 35 e 50 % (v/v) da polpa. A escolha dessas concentrações deve-se a ausência de estudos que utilizam concentrações acima de 20% (v/v) da polpa do maracujá da Caatinga na formulação de alimentos probióticos (SANTOS *et al.*, 2017; FARIAS *et al.*, 2016). O pH foi ajustado para 6 com NaOH (2M) utilizando um potenciômetro (P62000, Gehaka). Em seguida, foi realizada a pasteurização em banho maria (TE-084, Pyrotec) durante 35 minutos a  $67 \pm 2$  °C, com posterior resfriamento em banho com gelo (FARIAS *et al.*, 2016).

#### 4.3.2. Produção de bebidas probióticas fermentadas e planejamento fatorial

Para elaborar as bebidas, o microrganismo probiótico foi reativado como descrito no item 4.1, e um inóculo de 10% v/v (SANTOS *et al.*, 2017) foi transferido para frasco de Erlenmeyer de 125 mL, contendo 50 mL do meio de cultura composto apenas da polpa do maracujá (item 4.3.1). O frasco de Erlenmeyer foi acondicionado em estufa (SP-101/216, LABOR) 37°C para a fermentação. O rendimento de ácido láctico a partir de consumo por substrato (glicose ou frutose) foi determinado pela Equação 3, onde o  $Y_{p/s}$  é o coeficiente de rendimento,  $\Delta P$  é a variação de produto durante o tempo de fermentação e  $\Delta S$  é a variação de substrato.

$$Y_{p/s} = \frac{\Delta P}{\Delta S} \quad (\text{Eq. 3})$$

Após as 24 horas de fermentação, foram adicionadas pectina e sacarose (10% m/V). A concentração de pectina variou de acordo com a Tabela 1. Como pode ser visto nesta tabela, as bebidas foram produzidas com diferentes concentrações de pectina e de polpa. As concentrações de pectina utilizadas foram definidas com base nos trabalhos de Santos *et al.* (2017) e Parkar *et al.* (2010). A Tabela 2 apresenta as condições dos ensaios de acordo com um planejamento fatorial  $2^2$  com três replicatas no ponto central. As amostras foram retiradas para a determinação de pH, viabilidade, ácidos orgânicos (cítrico e láctico) e açúcares redutores totais.

**Tabela 1** – Fatores e níveis do planejamento fatorial.

Fatores	Níveis		
	-1	0	+1
Concentração de Pectina (g/L)	5	12,5	20
Concentração de polpa (v/v)	20	35	50

Fonte: Autora (2022).

**Tabela 2** – Matriz de planejamento para elaboração das bebidas.

Amostra	Pectina	Polpa
1	-1	-1
2	+1	-1
3	-1	+1
4	+1	+1
5	0	0
6	0	0
7	0	0

Fonte: Autora (2022).

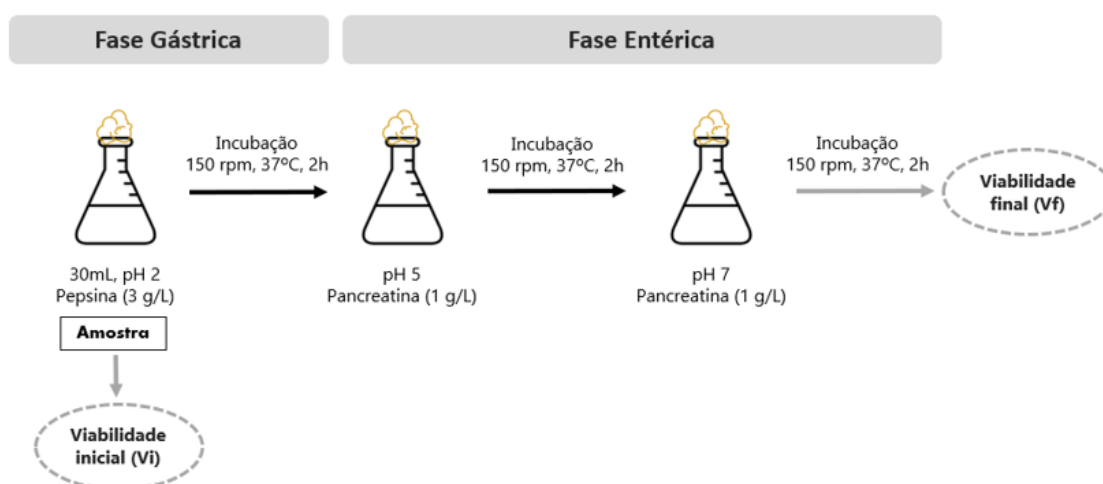
Dessa forma, foram elaboradas sete bebidas utilizando a pectina extraída, tendo a sobrevivência (Eq. 4) como resposta do planejamento. A sobrevivência ( $S$ ) pode ser calculada utilizando o valor de viabilidade ao final do estoque ( $v_f$ ) e viabilidade no início do estoque ( $v_i$ ). As bebidas foram acondicionadas na geladeira a 4°C por 28 dias. Os ensaios (1 a 4) foram realizados em duplicata.

$$S = \left( \frac{v_f}{v_i} \right) \times 100 \quad (\text{Eq. 4})$$

#### 4.4. Resistência de *Lacticaseibacillus rhamnosus* ATCC 7469 às condições de simulação gastrointestinal

A avaliação da viabilidade de *L. rhamnosus* ATCC 7469 em condições gastrointestinais simuladas foi realizada seguindo a metodologia descrita por (CHARTERIS *et al.*, 1998), sendo a adição de enzimas e alteração de pH realizadas na própria bebida. Inicialmente, foi utilizado um volume de 20 mL de cada amostra contendo as células da linhagem probiótica. O pH foi ajustado para 2,0 com solução de HCl 5M e colocada uma massa equivalente a 3 g/L de pepsina. Posteriormente, a mistura foi transferida para um Erlenmeyer de 250 mL estéril que foi colocado em um incubador rotativo (TE-422, Tecnal) com agitação de 150 rpm e temperatura de 37°C, durante 2 horas. Após este período, as amostras tiveram seu pH ajustado inicialmente para 5,0 com solução alcalina (NaOH e NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>2H<sub>2</sub>O) e em seguida foi adicionado pancreatina na concentração de 1 g/L. Foram colocados na incubadora rotativa, nas mesmas condições por 2 horas. Em seguida, o pH da solução foi ajustado para 7,0 utilizando novamente a solução alcalina e a concentração de pancreatina foi reajustada para 1 g/L, devido à variação no volume das soluções decorrente do ajuste do pH. Foi realizada uma última incubação nas mesmas condições anteriores por 2 horas.

**Figura 7** – Esquema da simulação gastrointestinal para verificação da resistência de *Lacticaseibacillus rhamnosus* ATCC 7469.



Fonte: Autora (2022).

A viabilidade de *L. rhamnosus* foi determinada em UFC/mL no início da fase gástrica e no final da fase entérica, e a partir disto, foram calculados os índices de sobrevivência da linhagem probiótica nas condições de simulação gastrointestinal, a partir da Equação 4 descrita

no tópico anterior, no entanto o  $V_f$  utilizado foi o valor pós fase intestinal e  $V_i$  a viabilidade no início da fase gástrica.

#### 4.5. Métodos analíticos

##### 4.5.1. Determinação do pH

Para as situações em que foram necessários ajuste e/ou determinação de pH, foi utilizado um potenciômetro digital (P62000, Gehaka).

##### 4.5.2. Determinação da umidade

Para a determinação da umidade da casca, da farinha da casca do maracujá e da pectina extraída, foi utilizado um analisador de umidade (MOC63u, Shymadzu).

##### 4.5.3. Determinação da viabilidade celular

A viabilidade celular, expressa em Unidades Formadoras de Colônia por mililitros (UFC/mL) foi determinada após o plaqueamento *spread plate* em meio caldo MRS, contendo 20 g/L de ágar, das diluições seriadas de cada bebida, em solução salina (0,9 % m/V - NaCl). Após inoculação, as placas foram acondicionadas em estufa (SP 101/216, Labor) a 37°C durante 48 horas.

##### 4.5.4. Determinação das concentrações dos ácidos orgânicos

As determinações dos ácidos cítrico e láctico foram realizadas por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE). Foi utilizada uma coluna de troca iônica (Aminex® HPX-87H, Bio-Rad, EUA),  $H_2SO_4$  (5 mM) como fase móvel e vazão 0,6 mL/min. O detector utilizado foi o de arranjo de diodos (DAD) e a temperatura da coluna foi 35 °C. O software utilizado para aquisição de dados foi o LC Solution, fabricado por Shimadzu Corporation (Kyoto, Japão). Para a quantificação das concentrações foram construídas curvas de calibração para cada ácido. As curvas apresentaram coeficiente de determinação maiores que 0,998.

##### 4.5.5. Determinação dos açúcares redutores totais

Com relação à determinação dos açúcares redutores totais foi utilizado o método colorimétrico proposto por Miller (1959). Para determinação da concentração, 1 mL da amostra da bebida foi adicionado em um tubo de ensaio e as moléculas de sacarose presentes foram hidrolisadas com 1 mL de HCl concentrado a 67°C por 7 minutos, com posterior banho de gelo. Em seguida, a mistura foi neutralizada com NaOH 6M, utilizando-se fenolftaleína como

indicador. Em seguida, 0,5 mL dessa solução foi adicionado em tubos de ensaio contendo 1 mL de ácido dinitrosalicílico (DNSA). A mistura foi aquecida a 100°C por 5 minutos e depois resfriada em banho de gelo. Por fim, foram adicionados 20 mL de água destilada à solução e realizada a leitura da absorbância em espectrofotômetro (VIS-2006, Gehaka) a 540 nm. A concentração foi determinada utilizando uma curva de calibração com soluções padrão de glicose com coeficiente de determinação maior que 0,98.

#### 4.5.6. Determinação de compostos fenólicos totais

A análise da quantidade de compostos fenólicos foi realizada antes e após fermentação e ao final do tempo de estoque refrigerado. O método colorimétrico utilizando o reagente Folin-Ciocalteu foi usado para determinar os compostos fenólicos totais (SINGLETON *et al.*, 1999). Essa metodologia foi adaptada, onde as amostras foram misturadas com reagente de Folin-Ciocalteu a 3% (v/v) e carbonato de sódio a 10% (m/v). Em seguida, foi verificada a absorbância das misturas no espectrofotômetro (VIS-2006, Gehaka) a 765nm. Uma solução padrão de ácido gálico foi utilizada para construir a curva padrão, a qual apresentou coeficiente de determinação maior que 0,99, e os resultados foram expressos em mg equivalente de ácido gálico (GAE)/ 100 g da bebida.

#### 4.6. Análises do planejamento

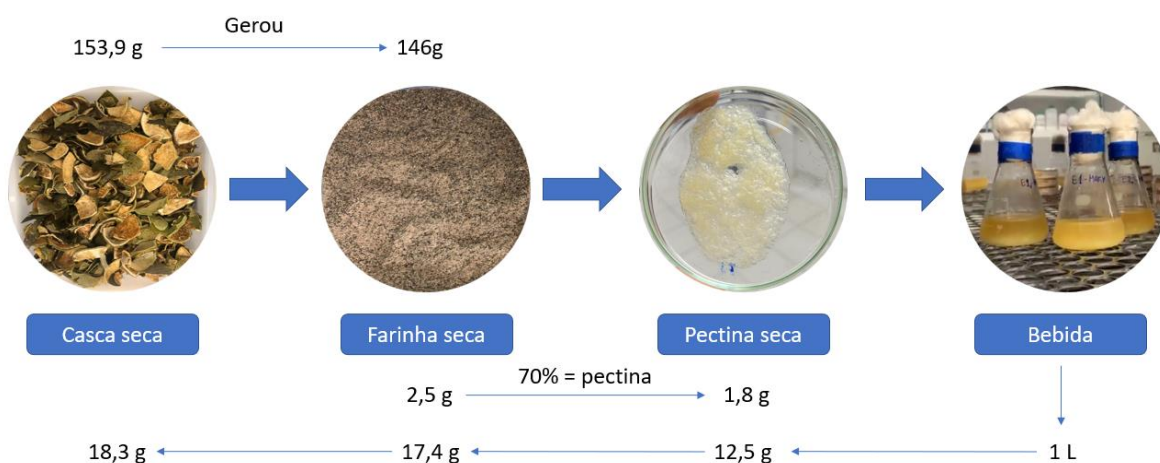
As análises estatísticas tiveram como base os valores médios a partir de duplicatas experimentais para todas as metodologias realizadas. Os dados obtidos foram analisados com o teste de variância (ANOVA) do programa Statistic software e com o teste de Tukey a partir do programa PAST software, ambos com nível de significância de 5 % ( $\alpha \leq 0.05$ ).

## 5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1. Rendimento da pectina extraída da farinha da casca do maracujá

Após a trituração e tamisação das cascas secas, foi observado um rendimento de farinha de 94,8% e rendimento gravimétrico médio da pectina extraída foi cerca de  $70\% \pm 2,4$  (m/m), calculado para as umidades da pectina, da farinha e da casca iguais a 63%, 5% e 81,46%, respectivamente. Os desvios padrão relativos foram menores do que 4 % em todas as medidas, indicando alta precisão dos valores. A partir disso, é possível observar que a quantidade de farinha necessária para se preparar 1L de bebida simbiótica com 5, 12,5 e 20 g/L de pectina seria de 7, 17,4 e 27,7 g, respectivamente, como pode ser verificado no exemplo da Figura 8. E a quantidade de casca seca necessária para se preparar essas bebidas seria um pouco mais que o peso da farinha, visto que 5% do conteúdo vegetal é perdido durante a etapa de processamento. Esses dados informam o quanto o maracujá da Caatinga é um fruto promissor na geração de pectina comercial e como a utilização de resíduos industriais, como as cascas, podem ser utilizadas de forma a render uma boa quantidade de um produto de alto valor agregado.

**Figura 8** – Esquema para determinação de quantidade necessária de farinha e casca de maracujá da Caatinga na produção da bebida fermentada.



Fonte: Autora (2022).

O método adequado para se obter pectina e o cuidado durante a técnica é de extrema importância para maximizar o rendimento da extração (MARIC *et al.*, 2018). As técnicas tradicionais, as quais fazem uso de ácidos minerais, apresentam algumas desvantagens como

perda de alguns compostos voláteis e alta toxicidade (SEIXAS *et al.*, 2014). Por outro lado, a utilização de ácidos orgânicos, como ácido cítrico, causa menos despolimerização da pectina e são menos prejudiciais ao meio ambiente (MARIC *et al.*, 2018). Esse tipo de extração já foi utilizado para obter pectina da casca de maracujá, polpa de beterraba e outras bases vegetais (LIEW *et al.*, 2014; LI *et al.*, 2015; OLIVEIRA *et al.*, 2016).

Raji *et al.* (2017) realizaram a extração da pectina da casca de melão utilizando ácido cítrico a 95 °C por 200 min e obtiveram um rendimento de 29,48% (m/m). Já Oliveira *et al.* (2016) observaram um rendimento inferior a 12,67% (m/m) de pectina extraída das cascas do maracujá amarelo por meio da utilização de ultrassom e ácido nítrico. Essa diferença no rendimento também pode ser visualizada em Yang *et al.* (2018), onde observaram que a utilização de ácido cítrico para extração de pectina em polpa de batata, ofereceu um rendimento maior em comparação com os outros ácidos utilizados (nítrico e clorídrico), em mesmas condições de extração. Com relação ao rendimento, outros fatores são importantes durante a obtenção da pectina, como temperatura, tempo de extração e agitação. Logo, são necessários mais estudos para que se possa afirmar que o ácido cítrico, em comparação com outros ácidos, como nítrico e clorídrico, é mais eficiente na extração desse polímero.

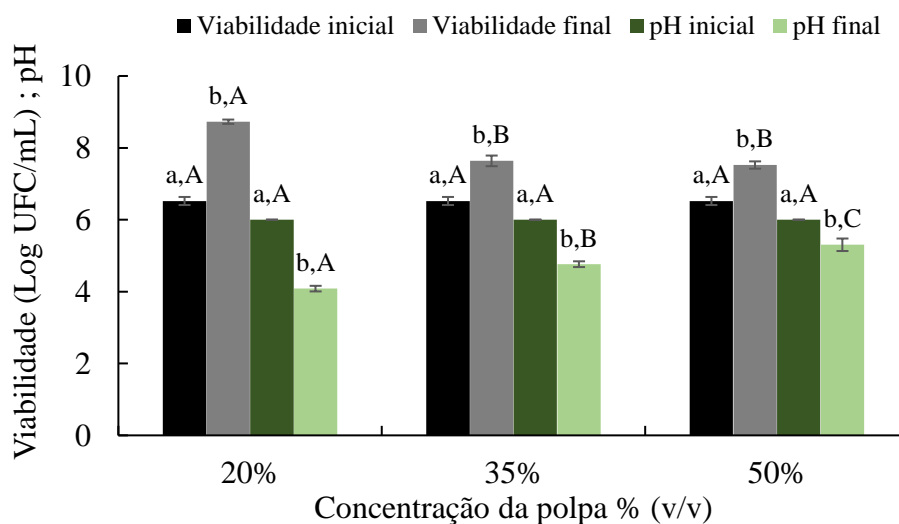
A pectina é um produto comercial, utilizado em diversos ramos industriais devido às suas propriedades. Por isso, a pesquisa de possíveis fontes e métodos de extração que otimizem o rendimento é de extrema relevância para o mercado. O maracujá é um fruto que tem recebido destaque por conta da quantidade de pectina presente em sua casca. Santos *et al.* (2016) utilizaram ácido cítrico e ultrassom por 90 minutos para a extração pectica da farinha da casca do maracujá amarelo e encontraram rendimento de 55% (m/m). Santos *et al.* (2017), que utilizaram a mesma técnica do presente trabalho, isto é, realizaram a extração utilizando um incubador rotativo e ácido cítrico, obtiveram um rendimento de 54,5% (m/m) de pectina da farinha da casca do maracujá da Caatinga.

Apesar de Santos *et al.* (2017) terem utilizado a mesma fruta e metodologia, com exceção do procedimento de filtração na última etapa, para obtenção de pectina, o resultado obtido no presente estudo demonstrou uma melhor extração. Enquanto estes autores usaram gaze para separar o coagulado da parte líquida, no presente trabalho foi utilizada uma peneira, como descrito no item 4.2.3. Além disso, a utilização de pipeta para retirar a parte líquida, antes da última filtração (Figura 6), provavelmente favoreceu uma separação e, consequentemente, gerou um maior rendimento. O cuidado na etapa de filtração final é de grande importância pois, caso haja alguma agitação que promova uma desagregação do coagulado, a separação se torna mais demorada e menos efetiva.

## 5.2. Bebidas fermentadas

Com relação a viabilidade, verificou-se que os ensaios com 20% (v/v) de polpa apresentaram um aumento de 2,2 Log (UFC/mL) alcançando uma viabilidade de 8,7 Log (UFC/mL) (Figura 9). Já os ensaios com 35% e 50% (v/v) de polpa apresentaram uma variação menor em comparação com os de 20% (v/v), aumentando em 1 e 1,1 Log (UFC/mL), respectivamente. Todos os ensaios mostraram viabilidade maior que 7,5 Log (UFC/mL), e segundo Lillo-Pérez *et al.* (2021), a quantidade mínima de células probióticas exigida por produto para garantir benefícios a microbiota intestinal é de 6 Log (UFC/mL), estando as bebidas acima do mínimo desejado.

**Figura 9** – Viabilidade no início e final das fermentações (37°C, 24h) variando a concentração da polpa. Para viabilidade/pH inicial e final de cada ensaio, diferentes letras minúsculas demonstram diferença estatística ( $P \leq 0,05$ ); e diferentes letras maiúsculas demonstram diferença estatística ( $P \leq 0,05$ ) entre os diferentes ensaios. A análise estatística foi baseada nos valores médios das replicatas de experimentos de mesma condição.



Fonte: Autora (2022).

Com relação ao consumo diário, a ANVISA (2008), determina que produtos probióticos devem conter um número mínimo de células viáveis entre 8 e 9 Log (UFC/mL) por dosagem do produto e manter essa proporção durante o tempo de armazenamento. Apenas os ensaios com 20% (v/v) de polpa apresentaram a quantidade mínima exigida pela legislação no início do estoque, de 8,7 Log (UFC/mL), podendo manter essa viabilidade durante o armazenamento



refrigerado e continuar dentro dos limites estabelecidos pela legislação. Já foi observado viabilidade semelhante (8 Log UFC/mL) após fermentação de suco de uva, cidra de maçã e suco de laranja com *L. rhamnosus* GR1 e em suco de beterraba (10 Log UFC/mL) também com *L. rhamnosus* GR1 (WHITE & HEKMAT, 2018; DUNKLEY & HEKMAT, 2020). Logo, é possível perceber que esta espécie vem se mostrando promissora para a formulação de bebidas probióticas vegetais, sendo capaz de manter boa viabilidade após fermentação em variados tipos de sucos.

Com relação ao pH, houve diminuição em todos os ensaios (Fig. 9), sendo aquele com menor concentração de polpa o que apresentou maior variação ( $\Delta\text{pH} = 1,9$ ), apresentando um pH final de 4,1. Os ensaios com 35 e 50% (v/v) de polpa atingiram o pH de 4,8 e 5,3, respectivamente, sendo a bebida com maior concentração de polpa a que apresentou uma menor variação no pH ( $\Delta\text{pH} = 0,7$ ). A redução no pH observada em todas as fermentações ocorre, principalmente, devido à produção de ácido lático, produto da fermentação láctica, que, por consequência, auxilia na conservação dos alimentos (FILHO *et al.*, 2019). De acordo com Panda *et al.* (2017), um meio em que o pH é menor que 4,5 tem a capacidade de inibir bactérias patogênicas e, consequentemente, prolongar a vida útil do alimento probiótico. Logo, uma concentração de polpa de 20% (v/v) de maracujá da Caatinga oferece um produto mais seguro com relação a qualidade higiênico-sanitária e, consequentemente, gera um melhor aproveitamento da matéria prima, gerando um lucro maior para quem produz. Ademais, a condição com 35% v/v de polpa, mostrou um valor de pH baixo, próximo ao citado por Panda *et al.* (2017), demonstrando ser uma matriz que também dificulta a permanência de patógenos.

É válido lembrar que as condições oferecidas no início da fermentação (pH ajustado para 6) foram favoráveis ao microrganismo, visto que o gênero *Lactobacillus* é capaz de crescer em meios levemente ácidos à neutros. *L. rhamnosus* tolera estresses ácidos e já foi descrito que o pH 6 é o ideal para crescimento de *L. rhamnosus* ATCC 7469 em suco de Maracujá da Caatinga (SUCCI *et al.*, 2005; FARIAS *et al.*, 2016; SANTOS *et al.*, 2017). De acordo com os dados encontrados, a menor concentração de polpa favoreceu o melhor desenvolvimento da linhagem e atingiu o menor valor de pH. As concentrações da polpa de maracujá da Caatinga menor ou igual a 20%, para *L. rhamnosus* ATCC 7469, tem sido as mais utilizadas em estudos (FARIAS *et al.*, 2016; SANTOS *et al.*, 2017). Farias *et al.* (2016) relataram que, com 20 horas de fermentação, o número de células viáveis, que antes era de 8 Log (UFC/mL), atingiu um valor de 10 Log (UFC/mL), utilizando uma concentração de polpa de 14,45% (v/v) e inóculo de 2,91% (v/v). No presente estudo, a partir da comparação entre diferentes concentrações, é possível observar certa sensibilidade da linhagem *L. rhamnosus* ATCC 7469 em meios mais

concentrados com a polpa do maracujá da Caatinga. Do ponto de vista econômico e produtivo, isso é algo positivo, visto que altas concentrações de polpa acarretariam em uma maior demanda de matéria prima e, conseqüentemente, maiores gastos. No caso dos probióticos isso seria ainda mais inviável pelo fato de os microrganismos não suportarem altas concentrações de polpa.

Filho *et al.* (2019) demonstraram que a fermentação de açúcares está relacionada com tempo, substrato utilizado e tipo de linhagem. Dessa forma, pode-se inferir que concentrações de polpa menores do que 35% (v/v) podem ser uma preferência de *L. rhamnosus* ATCC 7469 e pode influenciar no tempo de fermentação e na viabilidade, assim como descrito por esses autores. A utilização de concentrações entre 14,45 e 20% (v/v) de polpa do maracujá da Caatinga na formulação de bebidas simbióticas fermentadas tem sido descrita como adequada veículo para *L. rhamnosus* ATCC 7469 (FARIAS *et al.*, 2016; SANTOS *et al.*, 2017).

Na Tabela 3 é possível verificar as concentrações inicial e final de glicose e frutose nas fermentações. O consumo de glicose foi de 87,9%, 81,2% e 42,9% nas fermentações com concentrações de polpa de 20, 35 e 50 % (v/v), respectivamente. O consumo de frutose, por sua vez, foi de 98,1% nos ensaios de 20% (v/v) de polpa, semelhante ao de glicose, sendo consumido praticamente todo o açúcar. No entanto, nos ensaios com concentrações maiores de polpa, houve menor consumo da frutose presente no meio, sendo de 16,5% para as bebidas de 35% (v/v) de polpa e nenhum consumo nas fermentações com 50% (v/v) de polpa. Comparando as bebidas com concentrações maiores de polpa com as de 20% (v/v) de polpa, não houve consumo total desses açúcares nas bebidas mais concentradas. Sendo coerente com os dados obtidos de viabilidade, isto é, para um mesmo inóculo utilizado nas três condições, concentrações maiores de polpa necessitariam, provavelmente, de um maior tempo de fermentação para que ocorresse consumo próximo daquele obtido com 20 % (v/v) da polpa.

**Tabela 3** – Concentrações de glicose e frutose no processo fermentativo. Onde Gi: glicose inicial; Gf: glicose final; Fi: frutose inicial; Ff: frutose final; e AL: ácido láctico.

Polpa (%)	Gi (g/L)	Gf (g/L)	Fi (g/L)	Ff (g/L)	AL (g/L)
20	4,11 ±0,15	0,50 ±0,02	3,51 ±0,11	0,06 ±0,01	9,22 ±0,76
35	7,20 ±1,14	1,36 ±0,01	6,56 ±1,11	5,48 ±0,06	6,42 ±0,63
50	9,70 ±0,96	5,54 ±0,30	8,42 ±0,47	8,47 ±0,32	4,11 ±0,00

Fonte: Autora (2022).

Segundo Filho *et al.* (2019), o metabolismo de carboidratos muda de acordo com o tipo de microrganismo, estando a fermentação dos açúcares relacionada, não apenas às condições

do processo, mas também à linhagem utilizada. Entre os açúcares fermentáveis simples, a glicose e a frutose são os mais preferidos por *Lactobacillus*, porém a disponibilidade do carboidrato no meio pode interferir na escolha e forma de obtenção de energia (KLONGKLAIEW *et al.*, 2021). A avaliação desse consumo de açúcar, assim como a viabilidade, pode ser realizada em conjunto a produção de ácido láctico. Na Tabela 3, observa-se uma maior concentração de ácido láctico na concentração de 20% (v/v) de polpa, sendo coerente com os resultados de viabilidade e pH. Tendo em vista que o ácido láctico aumenta proporcionalmente ao crescimento e sua liberação altera o meio deixando-o mais ácido, os valores da concentração de ácido láctico nos ensaios com 35 e 50% (v/v) de polpa foram de 6,42 e 4,11 g/L, respectivamente, e demonstraram coerência com as menores viabilidades e maiores valores de pH encontrados nos respectivos grupos.

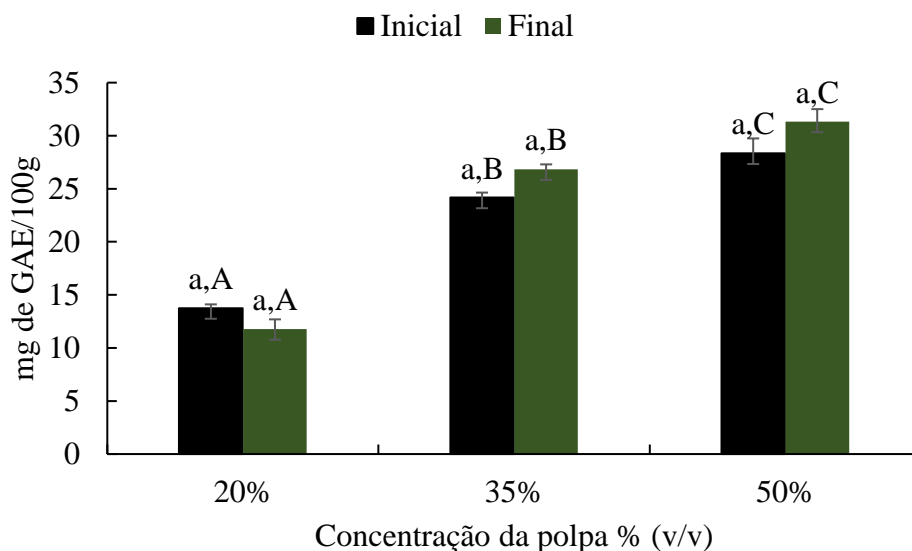
Os dados visualizados na Tabela 3, demonstraram que houve uma relação direta significativa ( $P \leq 0,05$ ) entre a concentração de polpa e produção de ácido láctico, onde um aumento na concentração da polpa resultou em um decaimento na produção do composto ácido. O coeficiente de rendimento do produto ( $Y_{P/S}$ ) é uma medida baseada na quantidade de produto formado e a quantidade de substrato consumido. Verificou-se que o  $Y_{P/S}$ , em relação ao conteúdo de açúcar total (glicose e frutose), foi maior na bebida com menor concentração de polpa (20% v/v) e maior produção de ácido láctico, sendo  $Y_{P/S} = 1,3$  g/g. Dessa forma, pode-se dizer que o ensaio com menor concentração de polpa demonstrou, durante período de fermentação, um consumo equivalente de ambos os açúcares culminando em uma produção de ácido láctico maior, em comparação aos outros ensaios. Nos ensaios com 35% e 50% (v/v) de polpa o rendimento foi menor em comparação ao de 20 % (v/v). Porém, o rendimento observado na condição de 50% não é levado em consideração, tendo em vista que não houve consumo de frutose. Essa preferência pelo açúcar glicose é observada por Nguyen *et al.* (2022), onde a fermentação por *Lactocaseibacillus rhamnosus* GG em pasta de pão contendo frutose e glicose, a glicose foi esgotada e a frutose foi parcialmente utilizada.

A explicação para as melhores respostas terem advindo dos ensaios com menores concentrações de polpa podem ser devido ao aumento de compostos antimicrobianos com o aumento de concentração de polpa. Tendo em vista que cada bebida possuía uma proporção diferente de polpa, a composição centesimal inicial dos ensaios era variável, podendo alterar de maneira diferente a viabilidade durante o tempo de fermentação. Dessa forma, podem haver substâncias antimicrobianas, como compostos fenólicos, presentes na polpa do maracujá da Caatinga que, em grande quantidade, podem influenciar na sobrevivência desses microrganismos (LEAL *et al.*, 2020; COSTA *et al.*, 2020).

Segundo Othman, Sleiman e Abdel-Massih (2019), a depender da quantidade, os polifenóis podem atuar tanto como ativadores quanto como inibidores do desenvolvimento bacteriano. Já foi relatado que altas concentrações de compostos fenólicos causam desnaturação proteica e podem alterar a permeabilidade da membrana celular microbiana (TAJKARIMI *et al.*, 2010; HASSANIEN *et al.*, 2014). Concentrações acima de 3 mM podem afetar a estrutura da membrana e o pH (FILANNINO *et al.*, 2014). Isso pode ocorrer devido ao fato de bactérias Gram-positivas possuírem uma estrutura membranar menos resistente, não possuindo um espaço periplasmático que abriga enzimas que degradam componentes antimicrobianos, e também pelo fato de os polifenóis possuírem regiões hidrofóbicas que interagem com a membrana lipídica, podendo integrar-se a ela e deixa-la mais instável (MAI-PROCHNOW *et al.*, 2016; PIEKARSKA-RADZIK e KLEWICKA. 2021). Além disso, os ácidos fenólicos tornam mais lenta a degradação de carboidratos por bactérias ácido lácticas (RODRÍGUES *et al.*, 2019).

As concentrações de fenólicos totais nas bebidas demonstraram estar em quantidades maiores nos ensaios com maiores concentrações de polpa (35 e 50% v/v) e não apresentaram variação significativa pós fermentação. Na Figura 9, observa-se que o ensaio com 20% (v/v), em comparação com as outras bebidas, possuía a menor concentração inicial de fenólicos e também não apresentou variação significativa ao final da fermentação. De acordo com Silva *et al.* (2020), a cultivar BRS sertão forte apresenta destaque na alta quantidade de compostos fenólicos, apresentando um teor de 53,5 mg GAE/ 100g em polpa de frutos em estágio intermediário de maturação, sendo a isoquercetina e ácido caftárico os compostos em maior concentração. Com o amadurecimento dos frutos ocorre a oxidação de compostos fenólicos, havendo diminuição no conteúdo dos mesmos (AMIRA *et al.*, 2012). Os estágios de maturação, o tipo de cultivo, a quantidade de chuvas, podem influenciar na composição centesimal desses frutos sendo, dessa forma, difícil fazer uma correlação exata entre os frutos no aspecto de composição. No entanto, as concentrações de fenólicos obtidas no trabalho estavam dentro do esperado, tendo em vistas que os frutos estavam em estágio intermediário e as bebidas encontravam-se diluídas, estando todas, inicialmente, com um conteúdo fenólico abaixo de 53,5 mg GAE/ 100g (Figura 10).

**Figura 10** – Concentração de compostos fenólicos totais antes e após 24 horas de fermentação. Para concentração de fenólicos inicial e final de cada ensaio, diferentes letras minúsculas demonstram diferença estatística ( $P \leq 0,05$ ); e diferentes letras maiúsculas demonstram diferença estatística ( $P \leq 0,05$ ) entre os diferentes grupos de concentrações. As letras A, B e C (maiúsculas ou minúsculas) representam os valores em ordem decrescente, onde A é o maior valor, B é menor que A e C menor que B.



Fonte: Autora (2022).

Como mencionado anteriormente, há diferentes ações dos compostos fenólicos a depender de sua concentração (OTHMAN, SLEIMAN e ABDEL-MASSIH, 2019). Já foi relatado, por exemplo, que o ácido gálico e a catequina nas concentrações do vinho de uva podem auxiliar no crescimento de *Lactobacillus hilgardii*, aumentando a taxa de consumo de glicose e frutose e, também, servindo de substrato (ALBERTO *et al.*, 2001). Por outro lado, Liu *et al.* (2016) observaram que *L. rhamnosus* GG teve o crescimento suprimido por dois compostos fenólicos, naringenina e quercetina, e que essa inibição era dose dependente, sendo a maior supressão ocorrendo em meios com doses mais altas desses fenólicos, com 75  $\mu\text{m/mL}$  de quercetina e meios com 200  $\mu\text{m/mL}$  de naringenina. Silva *et al.* (2020) relatou a presença de dois principais fenólicos na polpa do maracujá da Caatinga, isoquercetina (quercetina 3-glicosídeo) e ácido caftárico.

A inibição microbiana por compostos fenólicos ainda não é bem elucidada, sendo grande parte dos estudos sobre *L. plantarum* (FILANNINO *et al.*, 2014). Relacionando os resultados observados durante o período fermentativo, observa-se que o pH tem um

comportamento coerente com a quantidade de ácido láctico produzida e viabilidade, porém a quantidade de açúcar total consumida é semelhante nas concentrações de 20 e 35% (v/v) e baixa na de 50% (v/v). Logo, a explicação para esses fatos é de que, com o aumento da concentração de polpa, a utilização do açúcar presente no meio passa a ser utilizada em vias metabólicas de defesa contra os fenólicos (compostos antimicrobianos), resultando em uma quantidade de ácido láctico final diferente nos ensaios com 20 e 35% (v/v) e pequena no de 50% (v/v), já que o mesmo é produzido pela fermentação (via para obtenção de energia). Ou seja, o consumo dos carboidratos disponíveis não é voltado para crescimento da biomassa (gerando ácido láctico) e sim para proteção, culminando em uma redução no crescimento e baixa na produção desse ácido orgânico. Logo, condições com concentrações menores que 35% v/v de polpa apresentam maior consumo de açúcar durante fermentação e produção de ácido láctico.

As estratégias de defesa podem ser evidenciadas por um conjunto de mecanismos utilizados para driblar esses estresses causados à célula. Remoção de prótons ( $H^+$ ) através da bomba ATPase, alcalinização do meio externo, alteração na composição membranar e produção de proteínas são alguns exemplos de mecanismos para auxiliar na sobrevivência (COTTER e HILL, 2003). Enquanto houver esse controle de pH, a forma de reduzir a toxicidade desses compostos fenólicos é pela descarboxilação através da ação de enzimas que se expressam na presença dessas substâncias antimicrobianas (BARTHELMEBS, DIVIES & CAVIN, 2000). Dessa forma, a célula volta seu empenho para esses mecanismos de proteção, culminando na diminuição da produção de ácido láctico e aumento da viabilidade.

### **5.3. Influência das concentrações da polpa e da pectina sobre a viabilidade durante o estoque**

O planejamento fatorial  $2^2$  foi realizado para o período de estoque refrigerado de 28 dias a fim de avaliar a influência das diferentes concentrações de polpa e pectina nas variáveis de viabilidade, sobrevivência, pH, concentração de ácido láctico e ART. Após tratamento dos dados, foi verificado que os efeitos dos fatores não eram significativos frente a essas variáveis, sendo apenas significativo o modelo obtido para estabelecer a variação de ART durante armazenamento da bebida. A Tabela 4 apresenta os valores de viabilidade no início ( $V_i$ ) e após 28 dias ( $V_f$ ) de estoque refrigerado. Como um dos pontos centrais apresentou valores fora do esperado, não foi considerado nos cálculos do programa Statistica.

Durante o período de estoque, a viabilidade permaneceu acima de 8,0 Log (UFC/mL) nos ensaios 1 e 2, ambos com 20% v/v de polpa, e ficou acima de 7 Log (UFC/mL) nos ensaios de 3 a 6 (bebidas com concentração de polpa acima de 35%). Para garantir uma estabilidade

microbiológica em bebidas probióticas é ideal que no início do tempo de estoque a viabilidade inicial seja acima de 8 Log (UFC/mL) e, no momento do consumo, a concentração de células probióticas deve estar entre 7 e 8 Log (UFC/mL) para que as perdas durante passagem pelo trato gastrointestinal não influenciem na eficácia do produto (ANVISA, 2008; PANDA *et al.*, 2017; VALERO-CASES & FRUTOS, 2017). É possível observar que houve uma redução da viabilidade em todos os ensaios durante o período em refrigeração, porém todas as bebidas permaneceram em condições ideais para consumo, estando acima de 7 Log (UFC/mL).

**Tabela 4** – Viabilidade inicial e final durante tempo de estoque (28 dias à 4°C).

Ensaio	$v_i$ (Log UFC/mL)	$v_f$ (Log UFC/mL)
1	8,7 $\pm$ 0,06	8,5 $\pm$ 0,03
2	8,7 $\pm$ 0,06*	8,4 $\pm$ 0,02*
3	7,5 $\pm$ 0,10	7,4 $\pm$ 0,32
4	7,5 $\pm$ 0,10	7,4 $\pm$ 0,13
5	7,5*	7,0*
6	7,7*	7,0*

\*Valores com diferença estatística para  $P \leq 0,05$ . Fonte: Autora (2022).

Sabendo-se que a faixa de consumo diário por dosagem de produto fica entre 8 e 9 Log (UFC/mL), é importante identificar o momento correto de interromper a fermentação, ou seja, identificar o momento em que se atinjam valores esperados de viabilidade e pH, que proporcionem as características desejáveis ao alimento e que seja funcionalmente eficaz. Recomenda-se que adultos consumam em torno de 10 Log UFC/mL/dia durante 5 dias para que haja promoção da saúde (MORAIS & JACOB, 2006). No entanto, de acordo com Holzapfel *et al.* (1998) e Sanders (2003), tendo em vista que há uma baixa capacidade de microrganismos probióticos proliferarem e manterem a viabilidade, é importante, durante formulação, levar em consideração a diluição fisiológica no trato gastrointestinal, o tipo de linhagem utilizada, a capacidade da linhagem sobreviver a passagem no trato gastrointestinal e o efeito desejado ao organismo (BERTAZZONI *et al.*, 2013).

Diante do exposto, para que as outras bebidas, com concentrações maiores de polpa, estivessem de acordo com a legislação, seria necessário que elas tivessem um volume maior. Como a dosagem considerada no presente trabalho foi de 50 mL em todas as bebidas, para que os ensaios de 3 a 6 se encontrassem acima do mínimo estabelecido pela legislação para consumo diário, o volume teria que ser de, no mínimo, 57,1 mL, sendo necessário um aumento o volume

dos ensaios com 35 e 50% (v/v) de polpa. De acordo com a RDC 359 de 23 de dezembro de 2003, a porção considerada para sucos de frutas, soja e vegetais é de 200 mL, logo, todas as condições, nessa porção, estariam acima do número mínimo de células viáveis exigido pela legislação da ANVISA (2008).

O recomendado é que durante o estoque refrigerado não haja aumento da viabilidade, visto que o crescimento celular pode afetar as características sensoriais do produto e viabilidade, quando há grande liberação de ácido lático durante o consumo de açúcar. Altas concentrações desse ácido torna-o um agente antimicrobiano também para *Lactobacillus*, tendo em vista o estresse ácido causado (VALERO-CASES *et al.*, 2020). No caso do *L. rhamnosus* ATCC 7469 já foi observado tolerância em pH até 3,5 (SANTOS *et al.*, 2017). O ideal é que haja a manutenção da viabilidade, como observado no presente trabalho, onde a queda de células viáveis não foi significativa, estando todos os valores de sobrevivência (Tabela 5) próximos a 100% (valor médio =  $95,9 \pm 1,84\%$  e coeficiente de variação de 4,52%). É possível dizer que ocorreu um comportamento de manutenção celular.

**Tabela 5** – Sobrevivência de *L. rhamnosus* ATCC 7469 no estoque refrigerado por 28 dias.

Ensaio	Pectina (g/L)	Polpa (%)	Sobrevivência (%)
1	5	20	97,4
2	20	20	96,3
3	5	50	98,7
4	20	50	98,7
5	12,5	35	93,1
6	12,5	35	91,5

Fonte: Autora (2022).

A partir do conhecimento sobre o baixo valor do coeficiente de variação, calculado utilizando-se a média das sobrevivências de todos os ensaios do planejamento fatorial, foi possível prever que os efeitos das concentrações da pectina e da polpa não seriam significativos sobre a resposta. Na Tabela 6 é possível observar os efeitos e seus respectivos erros padrão e, a partir desses dados, é possível descobrir quais apresentam significância.



**Tabela 6** – Efeitos dos fatores e erros padrão do modelo relacionado a sobrevivência pós período de estoque.

	<b>Efeito dos fatores</b>	<b>Erro padrão</b>
Média	<b>95,9</b>	<b>1,84</b>
Pectina (g/L) (A)	-0,55	4,52
Polpa (%) (B)	1,86	4,52
AB	0,54	4,52

Fonte: Autora (2022).

Nesse caso, como o número de amostras é pequeno, o intervalo é determinado por meio de um valor encontrado na tabela de distribuição Student. Dessa maneira, para 95% de confiança, o valor do teste  $t$  (*Student*) é de 2,776. A partir da Equação 5, onde  $\eta$  corresponde ao valor real do efeito, é possível afirmar que os mesmos são significativos quando as estimativas encontradas ( $\eta^*$ ) forem superiores ao produto do erro padrão ( $s$ ) pelo valor  $t(\textit{student})$  tabelado (BENÍCIO, SCARMINIO & BRUNS, 2001). Tendo isso em vista, só será estatisticamente significativo, com 95% de confiança, um efeito cujo valor absoluto for superior a  $t(\textit{student}) \times s(\textit{efeito}) = 2,776 \times 4,52 = 12,5$ . Como estão todos abaixo desse valor, não houve significância de nenhum dos efeitos encontrados. Ou seja, a variação das concentrações de polpa e pectina, nos níveis do planejamento, não apresentaram influência na sobrevivência de *L. rhamnosus* ATCC 7469 durante o período de estoque. Dessa forma, qualquer concentração de pectina entre 5 e 20 g/L e concentração de polpa entre 20 e 50% (v/v) não influenciam na quantidade de células viáveis do microrganismo durante armazenamento refrigerado de 28 dias.

$$\eta^* - t_{(\textit{student})} \times s_{(\textit{efeito})} < \eta < \eta^* + t_{(\textit{student})} \times s_{(\textit{efeito})} \quad (\text{Eq. 5})$$

A utilização de concentrações maiores de pectina na formulação de bebidas simbióticas é algo positivo, não apenas do ponto de vista de seu efeito prebiótico, mas para aumentar o valor agregado do produto. Segundo a RDC nº 54 de 12 de novembro de 2012, um produto líquido contendo o mínimo de 2,5 g de fibra por porção (200mL) é considerado produto fonte. Dessa forma, os ensaios com maior concentração de pectina utilizados no trabalho (20 g/L), são potenciais produtos fontes de fibra e não exercem efeitos negativos sobre a sobrevivência dos microrganismos.

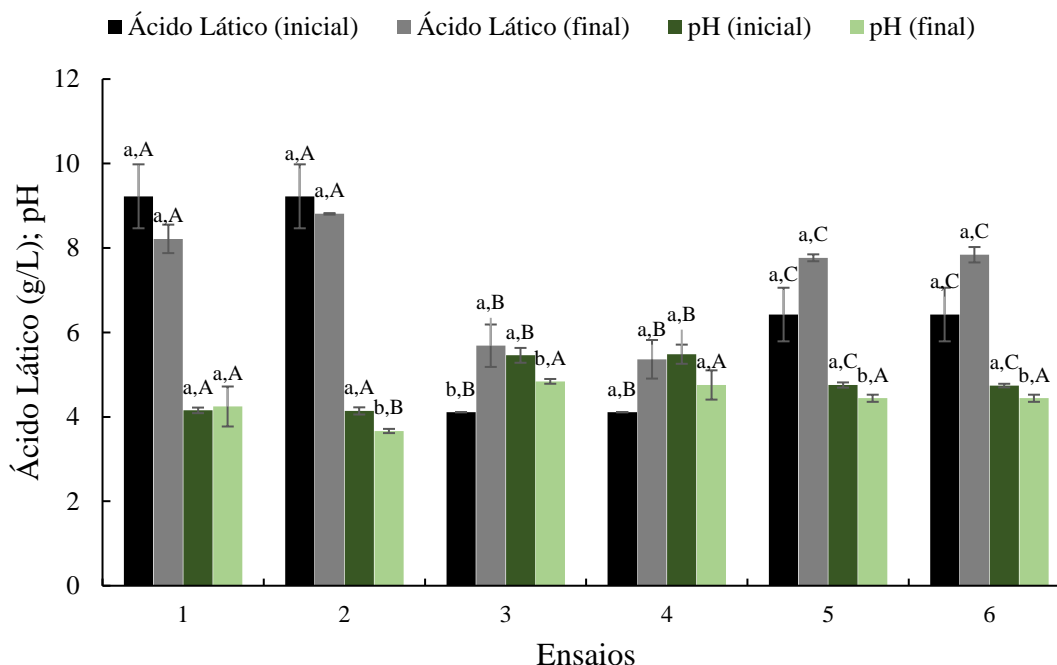
Tendo em vista que existem duas condições com concentração de pectina de 20 g/L, é possível dizer que baixas concentrações da polpa do maracujá da Caatinga, baixas concentrações de polpa, do ponto de vista econômico, configura um cenário interessante para indústrias alimentícias que querem ter um aproveitamento melhor da matéria prima, gerando maior quantidade de produtos e garantindo um maior retorno financeiro. Do ponto de vista sensorial, a utilização de maiores concentrações de polpa pode proporcionar uma maior satisfação do consumidor quanto ao sabor, porém é necessário driblar a ação antimicrobiana dos compostos fenólicos. Uma alternativa seria aumentar o tempo de fermentação, a fim de alcançar valores de viabilidade semelhantes aos ensaios com concentrações com 20% (v/v) de polpa. No entanto, esse maior tempo pode causar alterações indesejáveis no sabor da bebida, pois o metabolismo dos ácidos fenólicos gera compostos que afetam a qualidade do produto (GAUR et al., 2020). Logo, a concentração de 20% de polpa do maracujá da Caatinga e 20 g/L de pectina extraída constitui uma condição ideal para a formulação dos simbióticos, assim como a condição com 35% v/v de polpa e 12,5 g/L de pectina.

#### **5.4. Parâmetros físico-químicos: efeitos das concentrações da polpa e da pectina durante estoque**

Um mesmo planejamento fatorial foi realizado para o período de armazenamento refrigerado para avaliar a influência das concentrações de polpa e pectina no pH, ácido lático e concentrações de ART. Os fatores analisados influenciaram apenas o consumo de ART.

As concentrações de ácido lático nos ensaios 1 e 2 (20% v/v de polpa), antes e após o estoque, não apresentaram diferença significativa, assim como nos ensaios com 35% (v/v) de polpa (5 e 6). Em contrapartida, foi visualizado que o nos ensaios com 50% v/v de polpa houve variação na concentração de ácido lático durante o estoque, mas que foi significativa apenas para o ensaio 3 (5 g/L de pectina). Essa variação pode ser explicada pela maior concentração de substrato disponível, visto a pouca utilização do mesmo durante período fermentativo e melhor adaptação das células frente à grande quantidade de fenólicos. De maneira geral, os ensaios 5 e 6 (35% v/v de polpa) constituíram valores intermediários, estando entre os ensaios com 20 e 50% (v/v) de polpa, podendo esses valores serem visualizados na Figura 11.

**Figura 11.** Concentração de ácido lático e pH durante o período de estoque. Para os valores de 0 dias e 28 dias de cada ensaio (para concentração de ácido lático e pH), diferentes letras minúsculas apresentam diferença estatística ( $p \leq 0,05$ ).



Fonte: Autora (2022).

Ao final do estoque, observou-se que os valores de pH apresentaram variação significativa apenas nos ensaios 2, 3, 5 e 6. Nos ensaios 2, 5 e 6, a variação foi menor, coerente com os resultados de ácido lático, os quais permaneceram constantes durante o estoque. No entanto, o ensaio com 50% (v/v) de polpa e 5 g/L de pectina (ensaio 3) apresentou aumento no conteúdo lático e diminuição no pH, e como mencionado anteriormente, pode ter sido resultado de uma adaptação das células ao meio, culminando na produção de ácido lático e redução no pH. Santos *et al.* (2017) observaram em bebida fermentada, contendo 20% (v/v) da polpa do maracujá da Caatinga, 20 g/L de pectina e *L. rhamnosus* ATCC 7469, uma estabilidade no pH durante período de estoque refrigerado (28 dias), em torno de 3,7. Esse valor de pH observado no estudo de Santos *et al.* (2017) foi semelhante ao encontrado no presente trabalho, nas bebidas com mesma proporção de polpa. O pH inicial do estoque foi de  $4,1 \pm 0,02$ ,  $4,8 \pm 0,05$  e  $5,3 \pm 0,2$  para os ensaios com 20, 35 e 50% (v/v) de polpa, respectivamente, não havendo diferença significativa entre os ensaios com concentrações distintas de pectina, de acordo com o teste de Tuckey ( $p \leq 0,05$ ).

Com relação aos açúcares redutores totais (ART), na Tabela 7 é demonstrado o consumo de ART ( $\Delta$ ART) durante estoque refrigerado de 28 dias. É importante lembrar que, antes de seguir para estoque, foi adicionado em todos os ensaios uma quantidade de sacarose em uma concentração de 10% da bebida. Logo, os ensaios com 20% (v/v) de polpa, que ao final da fermentação continham uma concentração abaixo de 0,06 g/L de açúcar residual, possuíam no início do armazenamento uma quantidade de açúcar para consumo durante esse período. Na Tabela 7, verifica-se que houve consumo de ART em todos os ensaios. Farias *et al.* (2016), utilizando um inóculo de 2,91% (v/v) e concentração de polpa de maracujá da Caatinga de 14,45% (v/v), observaram que, durante o estoque, a concentração de ART não sofreu alterações significativas, permanecendo em torno de 14 g/L. Isso pode ser explicado pela concentração do inóculo ser menor em comparação com o inóculo utilizado no presente estudo. Por sua vez, Pereira *et al.* (2013) observaram em suco probiótico de caju, após adição de sacarose, uma redução no teor de açúcares redutores totais em torno de 30% durante 42 dias de armazenamento a 4°C. Assim como esses últimos autores, no presente estudo, as alterações observadas podem ser explicadas pela manutenção do conteúdo celular através da utilização do açúcar disponível, todavia, uma variação maior é observada no ensaio 4.

**Tabela 7** – Percentual utilizado de ART durante o período de estoque refrigerado.

Ensaio	Pectina (g/L)	Polpa (%)	ART inicial (g/L)	ART final (g/L)	$\Delta$ ART (%)
1	5	20	19,7	11,8	28,2
2	20	20	19,1	12,0	25,4
3	5	50	21,2	14,4	24,2
4	20	50	24,9	14,5	37,1
5	12,5	35	21,4	13,0	30,0
6	12,5	35	21,4	13,2	29,1

Fonte: Autora (2022).

A utilização de açúcares redutores totais revela a atividade microbiana no alimento e consequente estabilidade na viabilidade, considerado algo importante na produção de alimentos probióticos. Nas presentes condições, é observado que aquela que demonstrou maior variação no conteúdo de ART foi a que possuía maior quantidade de polpa e maior quantidade de pectina (ensaio 4). Esse resultado em conjunto com os dados obtidos a partir das análises de viabilidade, pH e concentração de ácido láctico, demonstram que, nesse caso, não houve utilização do açúcar nas vias de fermentação, pois não houve alteração significativa nas variáveis citadas. Para

melhor entendimento desse resultado, os efeitos dos fatores e seus respectivos erros padrão são apresentados na Tabela 8.

**Tabela 8** – Efeito dos fatores e erros padrão relacionados ao  $\Delta$ ART durante estoque.

	<b>Efeito dos fatores</b>	<b>Erro padrão</b>
Média	<b>29,01</b>	<b>0,31</b>
Pectina (g/L) (A)	<b>5,02</b>	<b>0,76</b>
Polpa (%) (B)	<b>3,89</b>	<b>0,76</b>
AB	<b>7,84</b>	<b>0,76</b>

Fonte: Autora (2022).

Utilizando o valor do teste t (*student*) (2,776) para nível de significância de 95%, é possível afirmar que todos os efeitos apresentam significância frente aos resultados da variação de ART, visto que o produto do erro padrão pelo teste t tabelado é 2,1, valor menor que os dos efeitos estimados. Isso implica dizer que as concentrações de polpa e pectina exercem influência no consumo de ART durante estoque refrigerado. Ou seja, dependendo da concentração de polpa e pectina utilizadas na produção da bebida simbiótica o consumo de ART pode variar. Um modelo linear polinomial foi obtido, de acordo com os resultados experimentais, para estabelecer o  $\Delta$ ART (Equação 6).

$$\hat{Y} = 29,01 + 2,51X_1 + 1,95X_2 + 3,92X_1X_2 \quad (\text{Eq. 6})$$

**Tabela 9** – Análise de variância (ANOVA) para modelo polinomial de  $\Delta$ ART.

<b>Fonte de variação</b>	<b>Soma quadrática</b>	<b>Graus de liberdade</b>	<b>Média quadrática</b>
Regressão	101,9218	3	33,9739
Resíduos	1,1575	2	0,5788
Falta de ajuste	0,8003	1	0,8003
Erro puro	0,3572	1	0,3572
Total	103,0793	5	20,6158

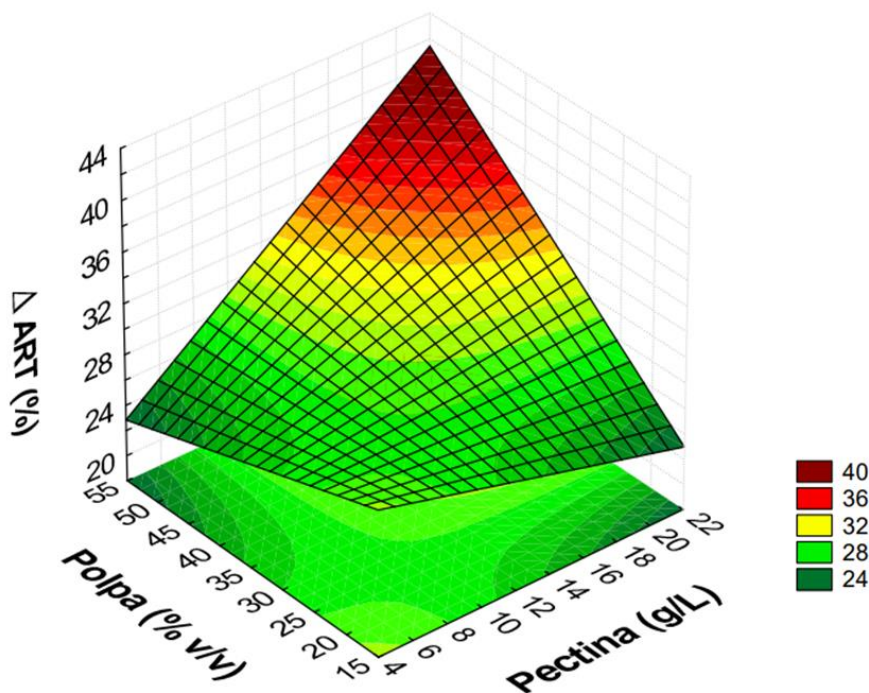
Fonte: Autora (2022)

O Teste-F foi utilizado para avaliar o nível de significância do modelo. Para isso, as médias quadráticas (MQ), demonstradas na Tabela 9, foram obtidas pela razão entre as somas quadráticas e os graus de liberdade e utilizadas em conjunto com o valor do Teste-F. A razão entre a MQ da regressão ( $MQ_R$ ) e a MQ residual ( $MQ_F$ ) precisa ser maior que o valor do Teste-

F tabelado ( $F_{tab}$ ) para 95% de significância ( $F_{tab} = 19,16$ ). Nesse caso o valor encontrado para  $MQ_R/MQ_r$  foi de 58,70 e foi maior que o  $F_{tab}$ , conferindo significância a regressão. Já o valor da razão entre a MQ por falta de ajuste ( $MQ_{fa}$ ) e MQ pelo erro puro ( $MQ_{ep}$ ) foi de 2,24, o qual deve ser menor que o valor do Teste-F tabelado ( $F_{tab} = 161,4$ ) para que não haja significância dos erros. O coeficiente de determinação ( $R^2$ ), por sua vez, foi de 0,9888, demonstrando que o modelo polinomial representou de forma adequada as variáveis escolhidas para o estudo.

Os efeitos das variáveis foram significativos e o modelo gerado é capaz de representar uma relação entre as mesmas. Essa relação é melhor observada na Figura 12, que representa a superfície de resposta, onde é possível observar o comportamento da  $\Delta ART$  em função das variáveis independentes (concentrações de pectina e polpa). Um aumento na concentração da polpa e na concentração de pectina gera um aumento no consumo de ART. Ou seja, quando as concentrações são próximas aos níveis +1 (20 g/L – pectina e 50% v/v de polpa) há uma maior utilização do açúcar presente.

**Figura 12.** Superfície de resposta obtida para a variação de ART em função das concentrações de polpa e pectina do maracujá da Caatinga durante período de estoque refrigerado das bebidas.



Fonte: Autora (2022)

O controle do consumo de açúcar durante o período de estoque é de suma importância, tendo em vista que uma grande depleção nesses compostos pode afetar o sabor do produto. Mesmo que as vias de utilização dos carboidratos não sejam para produção de ácido lático e sim para descarboxilação dos compostos fenólicos, os componentes gerados por essas reações afetam as propriedades organolépticas e diminuem a aceitação pelo consumidor. Logo, um consumo abaixo de 30%, como visualizado por Pereira *et al.* (2013), é ideal para manutenção celular e garante a estabilidade do produto. Essas informações enfatizam que maiores concentrações de polpa em conjunto com maiores concentrações de pectina podem auxiliar na permanência dos microrganismos durante estoque refrigerado, mas não configuram um potencial produto com qualidade e características sensoriais atrativas.

#### **5.5. Influência das concentrações de polpa e pectina na sobrevivência de *Lactocaseibacillus rhamnosus* ATCC 7469 na simulação das condições gastrointestinais**

Para avaliar os efeitos das concentrações de polpa e pectina na viabilidade final e na sobrevivência do probiótico após simulação de condições gastrointestinais (TGI), foi aplicado o planejamento fatorial. Os efeitos não apresentaram significância quanto a sobrevivência (Tabela 10). Observa-se que os ensaios com 20 e 35% (v/v) de polpa (ensaios 1, 2, 5 e 6) apresentaram decaimento significativo desse parâmetro tendo viabilidade final acima de 3 Log UFC/mL. Nos ensaios com 50% (v/v) de polpa não houveram bactérias viáveis após passagem pelas condições gastrointestinais simuladas. A sobrevivência observada após simulação gastrointestinal pós período de estoque na concentração de 35% (v/v) foi a maior, sendo de 43,45%, próximo ao valor encontrado por Santos *et al.* (2017), que foi de 53,59% (Viabilidade Inicial: 4,70 Log UFC/mL; Viabilidade Final: 2,52 Log UFC/mL). Porém, os resultados apresentados no presente estudo demonstraram valores de viabilidade após armazenamento e teste gastrointestinal maiores, comparados ao de Santos *et al.* (2017).

**Tabela 10** – Viabilidade após passagem por simulação gastrointestinal.

Ensaio	Pectina (g/L)	Polpa (%)	Viabilidade (Log UFC/mL)	Sobrevivência (%)
1	5	20	3,6	43,0
2	20	20	3,5	41,1
3	5	50	0	0,0
4	20	50	0	0,0
5	12,5	35	3	43,6
6	12,5	35	3,1	43,3

Fonte: Autora (2022).

É possível observar diante dos dados apresentados que, quando ocorre um aumento na concentração de polpa de 20 para 50 % (v/v), a sobrevivência reduz a zero, independente da concentração de pectina. Da mesma forma, quando aumenta-se a concentração de pectina de 5 para 20 g/L, a sobrevivência não sofre alteração, independente da concentração de polpa. Logo, após a análise estatística do planejamento, os efeitos das concentrações de polpa e de pectina sobre a sobrevivência não são significativos. Na Tabela 11, verifica-se os efeitos dos fatores e os erros padrão relacionados a viabilidade final.

**Tabela 11** – Efeito dos fatores e erros padrão relacionados à viabilidade de *L. rhmanosus* ATCC 7469 após simulação gastrointestinal.

	Efeito dos fatores	Erro padrão
Média	<b>2,03</b>	<b>0,20</b>
Pectina (g/L) (A)	-0,10	0,47
Polpa (%) (B)	<b>-3,55</b>	<b>0,47</b>
AB	0,10	0,47

Fonte: Autora (2022)

Um modelo linear também foi obtido para a viabilidade pós simulação gastrointestinal nos ensaios, com coeficiente de determinação  $R^2$  de 0,9061 (Equação 7). A análise de variância apresentada na Tabela 12 demonstrou que o modelo foi capaz de representar uma relação com as variáveis estudadas. O valor da razão de  $MQ_R/MQ_r$  foi de 19,30, sendo maior que o  $F_{tab}$  (4,76), conferindo significância ao modelo. No entanto, a relação  $MQ_{fa}/MQ_{ep}$  apresentou um valor de 867, sendo maior que o valor do Teste-F tabelado ( $F_{tab} = 6,61$ ) e demonstrando uma



significância dos erros, mais especificamente de falta de ajuste. Dessa forma, não houve erro experimental, e sim falta de ajuste ao modelo.

$$\hat{Y} = 2,03 - 0,05X_1 - 1,78X_2 + 0,05X_1X_2 \quad (\text{Eq. 7})$$

**Tabela 12** – Análise de variância (ANOVA) para modelo polinomial da viabilidade pós simulação gastrointestinal.

<b>Fonte de variação</b>	<b>Soma quadrática</b>	<b>Graus de liberdade</b>	<b>Média quadrática</b>
Regressão	25,2450	3	8,4150
Resíduos	2,6160	6	0,4360
Falta de ajuste	2,6010	1	2,6010
Erro puro	0,0150	5	0,0030
Total	27,8610	9	3,0956

Fonte: Autora (2022)

Apesar do modelo linear não está bem ajustado, a análise dos efeitos mostra que o aumento da concentração de polpa diminui a sobrevivência na simulação gastrointestinal. Contudo, é importante frisar que, ainda assim, a concentração de 35 % poderia ser utilizada, uma vez que a sobrevivência é praticamente a mesma dos ensaios 1 e 2, isto é, quando a polpa é 20% (v/v). É possível perceber que há uma influência da etapa de fermentação nas respostas observadas, pois concentrações menores de polpa favoreceram o melhor desenvolvimento do microrganismo. Condições com 20 e 35% (v/v) de polpa demonstraram um consumo de açúcar total (glicose e frutose) semelhante pelos microrganismos e o  $Y_{p/s}$  obtido foi semelhante em ambas. Além disso, observa-se que ao contrário da etapa de fermentação, em que o maior crescimento foi evidenciado apenas pela condição com 20% (v/v) de polpa, a análise de TGI demonstrou semelhança entre as condições de 20 e 35% (v/v) quanto à sobrevivência.

Nesse caso, qualquer quantidade de pectina, entre 5 e 20 g/L, nessas menores condições de concentração de polpa, pode ser utilizada na produção da bebida probiótica que a concentração da mesma não vai influenciar na viabilidade. Recebendo destaque a condição do ponto central (35% v/v de polpa e 12,5 g/L de pectina), pois possui maior quantidade de polpa, maior quantidade de pectina e apresenta características potenciais de qualidade, funcionalidade e sensorial para consumo do produto. É importante frisar que Santos *et al.* (2017) observaram que a presença de pectina (20 g/L) em bebidas com 20% de polpa de maracujá da Caatinga forneceu uma proteção aos microrganismos durante simulação gástrica e intestinal em comparação com bebidas na ausência do prebiótico. Além disso, Santos *et al.* (2017) notaram,

após simulação gastrointestinal, que a pectina extraída garantia uma maior sobrevivência ao *L. rhamnosus* ATCC 7469 em comparação com a pectina comercial. Todavia, o presente estudo trouxe uma concentração maior de polpa com respostas ideais de viabilidade final, pH e sobrevivência.

O efeito protetivo das pectinas aos microrganismos durante simulação do trato gastrointestinal é conferido devido a estimulação de proteínas de pH ácido que podem estar correlacionadas a resistência ao estresse (NAZARRO et al., 2012). Com relação a concentração dessa biomolécula complexa no meio nutritivo, Parkar *et al.* (2010) observaram que o aumento na concentração de pectina cítrica no meio afetava negativamente a sobrevivência de *L. rhamnosus* em condições simuladas do trato gastrointestinal, sendo o limite para sobrevivência de 5 g/L. Dessa forma, existe uma importância em se encontrar a concentração ideal de pectina, para que a mesma tenha efeito protetivo, confira alto valor nutricional ao alimento, mas que uma grande quantidade não afete negativamente a sobrevivência de probióticos quando na passagem por estresses.

Diante dos dados observados, pós TGI, a condição com 35% (v/v) de polpa apresentaram melhores resultados, proporcionando uma sobrevivência de quase 50% de *L. rhamnosus*, podendo isso ser explicado pelo menor estresse sofrido frente a baixa concentração de compostos fenólicos na bebida. Essa condição do ponto central, continha 12,5 g/L de pectina que não afetaram negativamente a sobrevivência dos microrganismos durante estresses, e apresentam uma quantidade que eleva o produto a categoria de fonte de fibra. Além disso o sabor do maracujá do mato será mais evidenciado devido a maior quantidade de polpa, em comparação com a condição de 20%. A condição com maior concentração de polpa, por sua vez, apresentou um meio mais estressante, que pode ter colaborado para que as células probióticas não suportassem a simulação pelo trato gastrointestinal.

## 6. CONCLUSÕES

A casca do maracujá da Caatinga BRS SF é uma fonte de pectina promissora, visto que o rendimento obtido na extração foi maior comparado aos observados em outros frutos, estando relacionado ao cuidado durante a etapa final de filtração do coagulado péctico. Logo, como apresentou um bom rendimento, a quantidade de casca constitui uma fonte capaz de gerar uma alta quantidade de produto de valor agregado. Além disso, a utilização de resíduos agroindustriais, como cascas de frutos, no desenvolvimento de produto de valor agregado, como a pectina, é de grande relevância atualmente, devido ao descarte inadequado desses materiais que culminam em um impacto ao meio ambiente.

Uma maior viabilidade foi observada ao utilizar baixas concentrações da polpa do maracujá da Caatinga durante a fermentação, podendo estar relacionado à menor quantidade de substâncias fenólicas presentes na polpa do maracujá. A alta concentração de compostos fenólicos, durante período de fermentação, pode ter afetado o crescimento de *L. rhamnosus* ATCC 7469 nas bebidas com concentrações de polpa acima de 35% (v/v), porém mais estudos são necessários para se comprovar essa hipótese.

A produção de ácido láctico e consumo de glicose e frutose durante processo fermentativo foi melhor visualizada nas bebidas com menores concentrações de polpa, estando coerente com os resultados de viabilidade. Dessa forma, as concentrações de 20 e 35% (v/v) de polpa constituíram uma matriz ideal na fermentação por *L. rhamnosus* ATCC 7469, o qual produziu ácido láctico em quantidades significativas, apresentando um pH final ótimo para conservação do produto em estoque.

Durante o estoque, a viabilidade de *L. rhamnosus* se manteve estável e em valores aceitáveis pela legislação, não sofrendo influência das concentrações de polpa e pectina. A concentração de ácido láctico durante período de estoque não sofreu alterações significativas, não afetando na viabilidade. O pH, por sua vez, permaneceu constante na maioria das bebidas, e não afetou a viabilidade durante os 28 dias em nenhuma das condições. Dessa forma, as diferentes condições do planejamento não apresentaram significância, configurando um bom resultado, levando em consideração que as determinadas variações de polpa e pectina não afetaram a qualidade do produto. No entanto, os ensaios com 20 e 35% (v/v) de polpa destacaram-se, pois, apresentaram pH ideal durante o período de 28 dias, promovendo baixas condições para a permanência de microrganismos patógenos.

O planejamento demonstrou que ambos os efeitos das concentrações de polpa e pectina foram significativos no consumo de ART durante período de estoque. A quantidade de ART sofreu maior redução na condição com maior concentração de polpa e pectina. Isso demonstrou que uma maior quantidade de açúcar disponível e maior concentração de pectina favorece um maior consumo de açúcar, o qual auxilia na sobrevivência e proteção contra as condições adversas durante período de 28 dias.

As bebidas após estoque e simulação gastrointestinal apresentaram decaimento no número de células viáveis. Esse dado demonstrou influência da etapa de fermentação, na qual as menores concentrações de polpa favoreceram um crescimento celular em conjunto com  $Y_{p/s}$  semelhantes e apresentaram, por consequência, maior sobrevivência após os estresses no pH. Mesmo que a viabilidade e sobrevivência tenham gerado modelos sem significância estatística, foi possível observar um impacto da concentração de polpa na sobrevivência, sendo a condição de 20 e 35% (v/v) de polpa as que apresentaram melhores resultados.

Logo, a bebida fermentada com 35% (v/v) da polpa destacou-se como potencial produto simbiótico devido à viabilidade do microrganismo, pH durante o período de estoque refrigerado e maior sobrevivência pós TGI. Além de ser um potencial produto fonte de fibra, pela quantidade de pectina, apresenta maior quantidade de polpa, o que o torna mais atrativo sensorialmente frente a concentração de 20% v/v. Esses resultados trazem um respaldo científico para a melhor utilização de polpas nas preparações de sucos probióticos, sendo algo importante do ponto de vista econômico, higiênico-sanitário, nutricional e sensorial.

## REFERÊNCIAS

- ALBA, Katerina; CAMPBELL, Grant M.; KONTOGIORGOS, Vassilis. Dietary fibre from berry-processing waste and its impact on bread structure: a review. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 99, n. 9, p. 4189-4199, 2019.
- ALBA, K.; KONTOGIORGOS, Vassilis. Pectin at the oil-water interface: Relationship of molecular composition and structure to functionality. **Food Hydrocolloids**, v. 68, p. 211-218, 2017.
- ALBERTO, María R.; FARÍAS, Marta E.; MANCA DE NADRA, María C. Effect of gallic acid and catechin on *Lactobacillus hilgardii* 5w growth and metabolism of organic compounds. **Journal of Agricultural and Food chemistry**, v. 49, n. 9, p. 4359-4363, 2001.
- ALMOHAMMED, Fouad et al. Pectin recovery from sugar beet pulp enhanced by high-voltage electrical discharges. **Food and Bioproducts Processing**, v. 103, p. 95-103, 2017.
- AMIRA, El Arem et al. Effects of the ripening stage on phenolic profile, phytochemical composition and antioxidant activity of date palm fruit. **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 60, n. 44, p. 10896-10902, 2012.
- ANDRADE, R. et al. Increased survival of *Lactobacillus rhamnosus* ATCC 7469 in guava juices with simulated gastrointestinal conditions during refrigerated storage. **Food Bioscience**, v. 32, p. 100470, 2019.
- ANVISA. Lista de alegações de propriedade funcional aprovadas para alimentos com alegações de propriedades funcionais e / ou de saúde, novos alimentos / ingredientes, substâncias bioativas e probióticos. Brasília, 2008.
- ANVISA.. Resolução da diretoria colegiada - RDC nº 241, de 26 de Julho de 2018. Disponível em:< [www.anvisa.gov.br/legis](http://www.anvisa.gov.br/legis)> Acessado em: 02 out. 2020.
- ARAÚJO, A. J. B. et al. Caracterização físico-química e perfil lipídico da semente de maracujá do mato (*Passiflora cincinnata* Mast.). **Embrapa Semiárido-Artigo em periódico indexado (ALICE)**, 2019.
- ARAÚJO, F.P.; SILVA N. da; QUEIROZ M.A. de. Divergência genética entre acessos de *Passiflora cincinnata* mast com base em descritores morfoagronômicos. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 30, n. 3, p. 723-730, 2008.
- ARIOLI, Stefania et al. Quantitative recovery of viable *Lactobacillus paracasei* CNCM I-1572 (*L. casei* DG®) after gastrointestinal passage in healthy adults. **Frontiers in microbiology**, p. 1720, 2018.
- ASHAOLU, T. J. Immune boosting functional foods and their mechanisms: A critical evaluation of probiotics and prebiotics. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 130, p. 110625, 2020.

BAKR, S.A. The potential applications of probiotics on dairy and non-dairy foods focusing on viability during storage. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 4, p. 423 – 431, 2015.

BARBOSA, Ilsa C. et al. Influência da adição de *Lactobacillus acidophilus* La-05, *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* Bb-12 e inulina nas características tecnológicas, físico-químicas, microbiológicas e sensoriais do queijo de cabra cremoso. **Comida e função**, v. 7, n. 10, pág. 4356-4371, 2016.

BARTHELMEBS, Lise; DIVIES, Charles; CAVIN, Jean-François. Knockout of the p-coumarate decarboxylase gene from *Lactobacillus plantarum* reveals the existence of two other inducible enzymatic activities involved in phenolic acid metabolism. **Applied and environmental microbiology**, v. 66, n. 8, p. 3368-3375, 2000.

BEHERA, Bikash Chandra; MISHRA, Rashmiranjan; MOHAPATRA, Sonali. Microbial citric acid: Production, properties, application, and future perspectives. **Food Frontiers**, v. 2, n. 1, p. 62-76, 2021.

BENÍCIO, BN de; SCARMINIO, I. S.; BRUNS, R. E. Como fazer experimentos. **Editores da Unicamp, Campinas**, 2001.

BEVILACQUA, A.; CAMPANIELLO, D.; CORBO, M.R. et al. Suitability of *Bifidobacterium* spp. And *Lactobacillus plantarum* as Probiotics Intended for Fruit Juices Containing Citrus Extracts. **Journal of Food Science**, v. 78, n. 11, p. M1764 - M1771, 2013.

BERNAL-CASTRO, Camila Andrea; DÍAZ-MORENO, Consuelo; GUTIÉRREZ-CORTÉS, Carolina. Inclusion of prebiotics on the viability of a commercial *Lactobacillus casei* subsp. *rhamnosus* culture in a tropical fruit beverage. **Journal of food science and technology**, v. 56, n. 2, p. 987-994, 2019.

BERNARDEAU, Marion et al. Safety assessment of dairy microorganisms: the *Lactobacillus* genus. **International journal of food microbiology**, v. 126, n. 3, p. 278-285, 2008.

BERTAZZONI, Elisa *et al.* Probiotics and clinical effects: is the number what counts?. **Journal of chemotherapy**, v. 25, n. 4, p. 193-212, 2013.

BOTTARI, Benedetta; CASTELLONE, Vincenzo; NEVIANI, Erasmo. Probiotics and COVID-19. **International journal of food sciences and nutrition**, v. 72, n. 3, p. 293-299, 2021.

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

BURITI, F.C.A.; SAAD, S.M.I. Bactérias do grupo *Lactobacillus casei*: caracterização, viabilidade como probióticos em alimentos e sua importância para a saúde humana. **Archivos Latinoamericanos de Nutricion**, v. 57, n. 4, p. 373 - 380, 2007.

CANTERI M.H.G. LIRIAN MORENO, GILVAN WOSIACKI; AGNES DE P. SCHEER. Pectina: da Matéria-Prima ao Produto Final. **Polímeros**, v. 22, n. 2, p. 149 - 157, 2012.

CAMPOS, F. M.; COUTO, J. A.; HOGG, T. A. Influence of phenolic acids on growth and inactivation of *Oenococcus oeni* and *Lactobacillus hilgardii*. **Journal of Applied Microbiology**, v. 94, n. 2, p. 167-174, 2003.

CARICILLI, A.M.; SAAD, M.J. The role of gut microbiota and insulin resistance. **Nutrients**, v.5, n.3, p. 829-851, 2013.

CENCIC, Avrelja; CHINGWARU, Walter. The role of functional foods, nutraceuticals, and food supplements in intestinal health. **Nutrients**, v. 2, n. 6, p. 611-625, 2010.

CHANG, C.P.; LIEW, S.L. Growth medium optimization for biomass production of a probiotic bacterium, *Lactobacillus rhamnosus* ATCC 7469. **Journal of Food Biochemistry**, v. 37, p. 536-543, 2013.

CHARTERIS, W. P. et al. Development and application of an in vitro methodology to determine the transit tolerance of potentially probiotic *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* species in the upper human gastrointestinal tract. **Journal of applied microbiology**, v. 84, n. 5, p. 759-768, 1998.

CHAVAN, Prasad; SINGH, Avdesh Kumar; KAUR, Gagandeep. Recent progress in the utilization of industrial waste and by-products of citrus fruits: A review. **Journal of Food Process Engineering**, v. 41, n. 8, p. e12895, 2018.

CHEN, Jun et al. Pectin modifications: a review. **Critical reviews in food science and nutrition**, v. 55, n. 12, p. 1684-1698, 2015.

CHOTIKO, Arranee; SATHIVEL, Subramaniam. Development of a combined low-methoxyl-pectin and rice-bran-extract delivery system to improve the viability of *Lactobacillus plantarum* under acid and bile conditions. **LWT-Food Science and Technology**, v. 66, p. 420-427, 2016.

CHRISTIAENS, Stefanie et al. Process–structure–function relations of pectin in food. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 56, n. 6, p. 1021-1042, 2016.

COLLADO, M. C.; ISOLAURI, E.; SALMINEN, S.; SANZ, Y. The impact of probiotic on gut health. *Current Drug Metabolism*. **Bethesda**, v. 10, n. 1, p. 68-78, 2009.

COQUEIRO, A. Y.; PEREIRA, J. R. R.; GALANTE, F. Farinha da casca do fruto de *Passiflora edulis* f. *flavicarpa* Deg (maracujá-amarelo): do potencial terapêutico aos efeitos adversos. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 18, n. 2, p. 563-569, 2016.

CÓRDOVA, K. R. V. et al. Características físico-químicas da casca do maracujá amarelo (*Passiflora edulis* *Flavicarpa* Degener) obtida por secagem. **Boletim do Centro de Pesquisa de Processamento de Alimentos**, v. 23, n. 2, 2005.

COSTA, Camila F. et al. Potential use of passion fruit (*Passiflora cincinnata*) as a biopreservative in the production of coalho cheese, a traditional Brazilian cheese. **Journal of dairy science**, v. 103, n. 4, p. 3082-3087, 2020.

COSTA, M.G.M.; FONTELES, T.V.; DE JESUS, A.L.T.; RODRIGUES, S. Sonicated pineapple juice as substrate for *L. casei* cultivation for probiotic beverage development: process optimization and product stability. **Food Chemistry**, v. 139, p. 261 - 266, 2013.

COSTA, Vanessa Moreira. **Perfil de metabólitos excretados por *Lactobacillus* isolados de processos industriais de produção de etanol, com ênfase nos isômeros óticos D (-) e L (+) do ácido láctico**. 2006. Tese de Doutorado. Universidade de São Paulo.

COTTER, Paul D.; HILL, Colin. Surviving the acid test: responses of gram-positive bacteria to low pH. **Microbiology and molecular biology reviews**, v. 67, n. 3, p. 429-453, 2003.

CRUZ, A. G.; FARIA, J. A. F.; VAN DENDER, A. G. F. Packaging system and probiotic dairy foods. **Food Research International**, v. 40, n. 8, p. 951-956, 2007.

CUEVA, Carolina et al. Antimicrobial activity of phenolic acids against commensal, probiotic and pathogenic bacteria. **Research in microbiology**, v. 161, n. 5, p. 372-382, 2010.

CUNNINGHAM, Marla et al. Shaping the future of probiotics and prebiotics. **Trends in Microbiology**, v. 29, n. 8, p. 667-685, 2021.

DA SILVA, V. S.; ORLANDELLI, R. C.. Desenvolvimento de alimentos funcionais nos últimos anos: uma revisão. **Revista Uningá**, v. 56, n. 2, p. 182-194, 2019.

DAVANI-DAVARI, D. et al. Prebiotics: definition, types, sources, mechanisms, and clinical applications. **Foods**, v. 8, n. 3, p. 92, 2019.

DE ARAÚJO, F. P.; FALEIRO, F. G. Maracujá de la Caatinga: *Passiflora cincinnata* Mast. 2020.

DI PIERRO, Francesco. A possible probiotic (*S. salivarius* K12) approach to improve oral and lung microbiotas and raise defenses against SAR S-CoV-2. **Minerva medica**, v. 111, n. 3, p. 281-283, 2020.

DRANCA, Florina; OROIAN, Mircea. Ultrasound-assisted extraction of pectin from *Malus domestica* 'Fălticeni' apple pomace. **Processes**, v. 7, n. 8, p. 488, 2019.

EMBRAPA. Embrapa lança primeira variedade de maracujá da Caatinga para cultivo comercial. 2016. Disponível em: < <https://www.embrapa.br/busca-de-noticias/-/noticia/13304501/embrapa-lanca-primeira-variedade-de-maracuja-da-caatinga-para-cultivocomercial>>. Acesso em: 31 de agosto de 2020.

ESPINAL-RUIZ, Mauricio et al. Impact of pectin properties on lipid digestion under simulated gastrointestinal conditions: Comparison of citrus and banana passion fruit (*Passiflora tripartita* var. *mollissima*) pectins. **Food Hydrocolloids**, v. 52, p. 329-342, 2016.

ESPÍRITO-SANTO, A. P.; LAGAZZO, A.; SOUZA, A. L. L. O. P.; PEREGO, P.; CONVERTI, A.; OLIVEIRA, M. N. Rheology, spontaneous whey separation, microstructure and sensorial characteristics of probiotic yoghurt enriched with passion fruit fiber. **Journal Food Research International**, v. 50 p. 224-231, 2013.



FALEIRO, F.G.; JUNQUEIRA, N.T.V.; BRAGA, M.F.; OLIVEIRA, E.J. de. Germoplasma e Melhoramento Genético do Maracujazeiro – histórico e Perspectivas. **Embrapa Cerrados**, Planaltina, p. 1 - 36, 2011.

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

FILANNINO, Pasquale et al. Hydroxycinnamic acids used as external acceptors of electrons: an energetic advantage for strictly heterofermentative lactic acid bacteria. **Applied and environmental microbiology**, v. 80, n. 24, p. 7574-7582, 2014.

FILHO, A. L. S. *et al.* Production and stability of probiotic cocoa juice with sucralose as sugar substitute during refrigerated storage. **LWT**, v. 99, p. 371-378, 2019.

FONSECA, Tiago Santos; DOS SANTOS, Renan Martins; DIAS-SOUZA, Marcus Vinícius. Preliminary investigation on the production of surface active compounds with antimicrobial and emulsifying properties by *Bacillus clausii* and *Lactobacillus rhamnosus* probiotic strains. **Bulletin of Pharmaceutical Sciences. Assiut**, v. 44, n. 1, p. 195-200, 2021.

FLINT, H. J.; DUNCAN, S.H.; LOUIS, P. The impact of nutrition on intestinal bacterial communities. **Current opinion in Microbiology**, v. 38, p. 59-65, 2017.

GARCÍA-RUIZ, A. et al. Potential of phenolic compounds for controlling lactic acid bacteria growth in wine. **Food Control**, v. 19, n. 9, p. 835-841, 2008.

GEREZ, Carla Luciana et al. Whey protein coating bead improves the survival of the probiotic *Lactobacillus rhamnosus* CRL 1505 to low pH. **Letters in applied microbiology**, v. 54, n. 6, p. 552-556, 2012.

GOMES, P. C.; DA COSTA MAYNARD, D.. Relação entre o hábito alimentar, consumo de probiótico e prebiótico no perfil da microbiota intestinal: Revisão integrativa. **Research, Society and Development**, v. 9, n. 8, p. e718986101-e718986101, 2020.

GRASSINO, Antonela Ninčević et al. Utilization of tomato peel waste from canning factory as a potential source for pectin production and application as tin corrosion inhibitor. **Food Hydrocolloids**, v. 52, p. 265-274, 2016.

GUL, Khalid; SINGH, A. K.; JABEEN, Rifat. Nutraceuticals and functional foods: The foods for the future world. **Critical reviews in food science and nutrition**, v. 56, n. 16, p. 2617-2627, 2016.

HOJSAK, I.; ABDOVIĆ, S.; SZAJEWSKA H. et al. *Lactobacillus* GG in the Prevention of Nosocomial Gastrointestinal and Respiratory Tract Infections. **Pediatrics**, v. 125, p. 1171 - 1177, 2010.

HOLZAPFEL, Wilhelm H. et al. Overview of gut flora and probiotics. **International journal of food microbiology**, v. 41, n. 2, p. 85-101, 1998.

HYUN, C., & SHIN, H. Utilization of bovine plasma obtained from a slaughterhouse for economic production of probiotics. *Journal of Fermentation and Bioengineering*. v. 86, p. 34–37, 1998.

INSTITUTO NOA. Intolerância à lactose atinge 35% dos brasileiros. 2017 Disponível em: <<https://www.institutonoa.org/singlepost/2017/07/13/Intoler%C3%A2ncia-%C3%A0-lactose-atinge-35-dos-brasileiros>>. Acessado em: 01 de setembro de 2020.

IRAPORDA, Carolina et al. Influence of inulin rich carbohydrates from Jerusalem artichoke (*Helianthus tuberosus* L.) tubers on probiotic properties of *Lactobacillus* strains. *LWT*, v. 101, p. 738-746, 2019.

JESUS, Railda et al. Desenvolvimento e aceitabilidade de um néctar misto de mangaba (*hancornia speciosa* gomes) e maracujá do mato (*passiflora. cincinnata* mast) adoçado com mel de *Apis mellífera*. *Enciclopédia Biosfera*, v. 14, n. 26, 2017.

JIANQIN, Sun et al. Effects of milk containing only A2 beta casein versus milk containing both A1 and A2 beta casein proteins on gastrointestinal physiology, symptoms of discomfort, and cognitive behavior of people with self-reported intolerance to traditional cows' milk. *Nutrition journal*, v. 15, n. 1, p. 1-16, 2015.

JORJÃO, A.L.; OLIVEIRA, F.E. DE.; LEÃO, M.V.P. et al. Live and Heat-Killed *Lactobacillus rhamnosus* ATCC 7469 May Induce Modulatory Cytokines Profiles on Macrophages RAW 264.7. *The ScientificWorld Journal*, p. 6, 2015.

KAZEMI, Asma et al. The effect of probiotics, parabiotics, synbiotics, fermented foods and other microbial forms on immunoglobulin production: a systematic review and meta-analysis of clinical trials. *International Journal of Food Sciences and Nutrition*, v. 72, n. 5, p. 632-649, 2021.

KHALED, Jamal MA. Probiotics, prebiotics, and COVID-19 infection: A review article. *Saudi Journal of Biological Sciences*, v. 28, n. 1, p. 865-869, 2021.

KLONGKLAEW, Augchararat et al. Improvement of Enantiomeric l-Lactic Acid Production from Mixed Hexose-Pentose Sugars by Coculture of *Enterococcus mundtii* WX1 and *Lactobacillus rhamnosus* SCJ9. *Fermentation*, v. 7, n. 2, p. 95, 2021.

KURIAN, Shilia Jacob et al. Probiotics in prevention and treatment of COVID-19: current perspective and future prospects. *Archives of medical research*, v. 52, n. 6, p. 582-594, 2021.

LARSEN, Nadja et al. The effect of pectins on survival of probiotic *Lactobacillus* spp. in gastrointestinal juices is related to their structure and physical properties. *Food microbiology*, v. 74, p. 11-20, 2018.

LEAL, Ana Ediléia Barbosa Pereira et al. Determination of phenolic compounds, in vitro antioxidant activity and characterization of secondary metabolites in different parts of *Passiflora cincinnata* by HPLC-DAD-MS/MS analysis. *Natural Product Research*, v. 34, n. 7, p. 995-1001, 2020.

LI, De-qiang et al. Combined effects of independent variables on yield and protein content of pectin extracted from sugar beet pulp by citric acid. **Carbohydrate polymers**, v. 129, p. 108-114, 2015.

LI, Tuoping et al. Antioxidant activity of penta-oligogalacturonide, isolated from haw pectin, suppresses triglyceride synthesis in mice fed with a high-fat diet. **Food chemistry**, v. 145, p. 335-341, 2014.

LI, Zhongxi et al. Enhanced antioxidant activity for apple juice fermented with *Lactobacillus plantarum* ATCC14917. **Molecules**, v. 24, n. 1, p. 51, 2019.

LIANG, L. I. et al. Casein and pectin: Structures, interactions, and applications. **Trends in Food Science & Technology**, v. 97, p. 391-403, 2020.

LIEW, S.L.; ARIFF A.B.; RAHA A.R.; HO Y.W. Optimization of medium composition for the production of a probiotic microorganism, *Lactobacillus rhamnosus*, using response surface methodology. **International Journal of Food Microbiology**, v. 102, p.137 - 142, 2005.

LIEW, S.Q.; CHIN, N. L.; YUSOF, Y. A. Extraction and characterization of pectin from passion fruit peels. **Agriculture and Agricultural Science Procedia**, v. 2, p. 231 - 236, 2014.

LILLO-PÉREZ, S. et al. Probiotics in fruit and vegetable matrices: Opportunities for nondairy consumers. **LWT**, v. 151, p. 112106, 2021.

LIMA, A.A.; CUNHA, M.A.P. Maracujá: produção e qualidade na passicultura. **Embrapa Mandioca e Fruticultura**, Cruz das Almas, p. 396, 2004.

LIU, L. et al. Genetic expression profile analysis of the temporal inhibition of quercetin and naringenin on *Lactobacillus rhamnosus* GG. **J Probiot Health**, v. 4, p. 139, 2016.

LOPEZ-LEGARREA, Patricia et al. The influence of Mediterranean, carbohydrate and high protein diets on gut microbiota composition in the treatment of obesity and associated inflammatory state. **Asia Pacific journal of clinical nutrition**, v. 23, n. 3, p. 360-368, 2014.

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

MAI-PROCHNOW, Anne et al. Gram positive and Gram negative bacteria differ in their sensitivity to cold plasma. **Scientific reports**, v. 6, n. 1, p. 1-11, 2016.

MANTZOURANI, Ioanna et al. Production of a potentially synbiotic fermented Cornelian cherry (*Cornus mas* L.) beverage using *Lactobacillus paracasei* K5 immobilized on wheat bran. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 17, p. 347-351, 2019.

MANTZOURANI, Ioanna et al. Functional pomegranate beverage production by fermentation with a novel synbiotic *L. paracasei* biocatalyst. **Food chemistry**, v. 308, p. 125658, 2020.

MARIĆ, Mirela et al. An overview of the traditional and innovative approaches for pectin extraction from plant food wastes and by-products: Ultrasound-, microwaves-, and enzyme-assisted extraction. **Trends in Food Science & Technology**, v. 76, p. 28-37, 2018.

MARKETS AND MARKETS. Dairy Alternatives Market by Source (Soy, Almond, Coconut, Rice, Oats, Hemp), Application (Milk, Cheese, Yogurt, Ice Creams, Creamers), Distribution Channel (Supermarkets, Health Stores, Pharmacies), Formulation and Region – Global Forecast to 2025. <<https://www.marketsandmarkets.com/Market-Report/s/dairy-alternative-plant-milk-beverages-market-677.html>>.: Acessado em 2 fevereiro 2022.

MARTINS, E.M.F.; RAMOS, A.M.; VANZELA, E.S.L. et al. Products of vegetable origin: a new alternative for the consumption of probiotic bacteria. **Food Research International**, v. 51, n. 2, p. 764 - 770, 2013.

MENDES, R. M. L.; DOS SANTOS, M. R.; RIBEIRO, E. Produção da farinha da casca de maracujá amarelo (*Passiflora edulis*) e maracujá da Caatinga (*Passiflora cincinnata*) para extração de pectina e aplicações na indústria de alimentos. **Avanços em Ciência e Tecnologia de Alimentos** - Volume 3. Local: Editora Científica Digital, p. 226-235, 2020.

MÍGUEZ, Beatriz et al. Prebiotic effects of pectooligosaccharides obtained from lemon peel on the microbiota from elderly donors using an in vitro continuous colon model (TIM-2). **Food & function**, v. 11, n. 11, p. 9984-9999, 2020.

MIN, Min et al. Non-dairy probiotic food products: An emerging group of functional foods. **Critical reviews in food science and nutrition**, v. 59, n. 16, p. 2626-2641, 2019.

MINJ, Jagrani et al. Bio-functional properties of probiotic *Lactobacillus*: current applications and research perspectives. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, p. 1-18, 2020.

MINJARES-FUENTES, R.; FEMENIA, A.; GARAU, M.C. et al. Ultrasound-assisted extraction of pectins from grape pomace using citric acid: A response surface methodology approach. **Carbohydrate Polymers**, v. 106, p. 179 - 189, 2014.

MIRANDA, Rayrinne Ferreira et al. Impact of the addition of *Lactobacillus casei* and oligofructose on the quality parameters of orange juice and hibiscus tea mixed beverage. **Journal of Food Processing and Preservation**, v. 43, n. 12, p. e14249, 2019.

MISHRA, A.; CHAKRAVARTY, I.; MANDAVGANE, S. Current trends in non-dairy based synbiotics. **Critical Reviews in Biotechnology**, v. 41, n. 6, p. 935-952, 2021.

MISHRA, SWATI S. ET AL. Advances in probiotics, prebiotics and nutraceuticals. In: **Innovations in technologies for fermented food and beverage industries**. Springer, Cham, p. 121-141, 2018.

MONTORSI, Francesco et al. Effectiveness of a combination of cranberries, *Lactobacillus rhamnosus*, and vitamin C for the management of recurrent urinary tract infections in women: results of a pilot study. **European Urology**, v. 70, n. 6, p. 912-915, 2016.

MOORTHY, I.G.; MARANB, J.P.; SURYAA, S.M. et al. Response surface optimization of ultrasound assisted extraction of pectin from pomegranate peel. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 72, p. 1323 – 1328, 2015.

MORAIS, Mauro Batista de; JACOB, Cristina Miuki Abe. The role of probiotics and prebiotics in pediatric practice. **Jornal de pediatria**, v. 82, p. S189-S197, 2006.

MOUSAVI, Z. E. et al. Fermentation of pomegranate juice by probiotic lactic acid bacteria. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 27, n. 1, p. 123-128, 2011.

MUHIALDIN, Belal J. et al. Metabolomic changes and biological activities during the lacto-fermentation of jackfruit juice using *Lactobacillus casei* ATCC334. **LWT**, v. 141, p. 110940, 2021.

MWANZIA, Margaret; KIIO, Juliana; OKOTH, Evelyn. Formulation, Processing and Characterization of Fermented Probiotic Mango Juice Using Selected Starter Cultures. **European Journal of Agriculture and Food Sciences**, v. 4, n. 1, p. 86-91, 2022.

NATT, Simranpreet Kaur et al. Production and Assessment of Probiotic Fruit Juice from Punjab Pink Variety of Guava. **Journal of Scientific and Industrial Research (JSIR)**, v. 81, n. 02, p. 125-130, 2022.

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

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

NGUYEN, Thuy-Linh et al. Biovalorization of Market Surplus Bread for Development of Probiotic-Fermented Potential Functional Beverages. **Foods**, v. 11, n. 3, p. 250, 2022.

OLIVEIRA, Cibele Freitas et al. Extraction of pectin from passion fruit peel assisted by ultrasound. **LWT-Food Science and Technology**, v. 71, p. 110-115, 2016.

OLIVEIRA, Túlio Ítalo S. et al. Optimization of pectin extraction from banana peels with citric acid by using response surface methodology. **Food Chemistry**, v. 198, p. 113-118, 2016.

OTHMAN, Leen; SLEIMAN, Ahmad; ABDEL-MASSI, Roula M. Antimicrobial activity of polyphenols and alkaloids in middle eastern plants. **Frontiers in microbiology**, v. 10, p. 911, 2019.

OUDE ELFERINK, Stefanie JWH et al. Anaerobic conversion of lactic acid to acetic acid and 1, 2-propanediol by *Lactobacillus buchneri*. **Applied and Environmental microbiology**, v. 67, n. 1, p. 125-132, 2001.

PANDA, Sandeep K. et al. Quality enhancement of prickly pears (*Opuntia* sp.) juice through probiotic fermentation using *Lactobacillus fermentum*-ATCC 9338. **LWT**, v. 75, p. 453-459, 2017.

PARKAR, S.G.; EMMA L. REDGATE, E.L.; WIBISONO, R. et al. Gut health benefits of kiwifruit pectins: Comparison with commercial functional polysaccharides. **Journal of Functional Foods**, v. 2, p. 2010 - 218, 2010.

PAYLING, L. et al. The effects of carbohydrate structure on the composition and functionality of the human gut microbiota. **Trends in Food Science & Technology**, v. 97, p. 233-248, 2020.

PEREIRA, Ana Lucia Fernandes; RODRIGUES, Sueli. Turning fruit juice into probiotic beverages. In: **Fruit juices**. Academic Press, p. 279-287, 2018.

PEREIRA, A. D.; CORRÊA, R. X.; OLIVEIRA, A. C. Molecular genetic diversity and differentiation of populations of „somnus“ passion fruit trees (*Passiflora setacea* DC): Implications for conservation and pre-breeding. **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 59, p.12 - 21, 2015.

PEREIRA, Ana Lúcia Fernandes et al. Estabilidade de armazenamento e aceitação de bebida probiótica de suco de caju. **Tecnologia de Alimentos e Bioprocessos** , v. 6, n. 11, pág. 3155-3165, 2013.

PERJÉSSY, Judit et al. Effect of the lactic acid fermentation by probiotic strains on the sour cherry juice and its bioactive compounds. **Food Science and Technology International**, p. 10820132211018044, 2021.

PHAM, Minh Tan et al. Gut probiotic *Lactobacillus rhamnosus* attenuates PDE4B-mediated interleukin-6 induced by SARS-CoV-2 membrane glycoprotein. **The Journal of nutritional biochemistry**, v. 98, p. 108821, 2021.

PIEKARSKA-RADZIK, Lídia; KLEWICKA, Elżbieta. Influência mútua de polifenóis e *Lactobacillus* spp. Bactérias em alimentos: Uma revisão. **Pesquisa e Tecnologia Alimentar Europeia**, v. 247, n. 1, pág. 24 a 9 de 2021.

PRANDI, Barbara et al. Pectin oligosaccharides from sugar beet pulp: Molecular characterization and potential prebiotic activity. **Food & function**, v. 9, n. 3, p. 1557-1569, 2018.

RAJI, Zarifeh et al. Extraction optimization and physicochemical properties of pectin from melon peel. **International journal of biological macromolecules**, v. 98, p. 709-716, 2017.

RASIKA, Dissanayake MD et al. Plant-based milk substitutes as emerging probiotic carriers. **Current Opinion in Food Science**, v. 38, p. 8-20, 2021.

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

REGUANT, C. et al. Influence of phenolic compounds on the physiology of *Oenococcus oeni* from wine. **Journal of Applied Microbiology**, v. 88, n. 6, p. 1065-1071, 2000.

RINALDI, Maria Madalena et al. Postharvest quality and shelf life of *Passiflora cincinnata* BRS Sertão Forte fruits according to type of fertilization and storage. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 44, 2022.

RIVERA-ESPINOZA, Y.; GALLARDO-NAVARRO, Y. Non-dairy probiotic products. **Food Microbiology**, v. 27, n. 1, p.1 - 11, 2010.

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

RODRÍGUEZ, Héctor et al. Food phenolics and lactic acid bacteria. **International journal of food microbiology**, v. 132, n. 2-3, p. 79-90, 2009.

RODRIGUES, Luiza Zancan et al. Microencapsulação de probióticos por gelificação iônica externa utilizando pectina. **Ciência e Natura**, v. 37, n. 5, p. 30-37, 2015.

ROPARTZ, David; RALET, Marie-Christine. Pectin structure. In: **Pectin: Technological and physiological properties**. Springer, Cham, p. 17-36, 2020.

SAAD, S. M. I. Probióticos e prebióticos: o estado da arte. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 42, p. 1–16, 2006.

SANCHEZ, Antonio et al. Elaboration and characterization of nanoemulsion with orange essential oil and pectin. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, 2021.

SANDERS, Mary Ellen et al. Probiotics and prebiotics in intestinal health and disease: from biology to the clinic. **Nature reviews Gastroenterology & hepatology**, v. 16, n. 10, p. 605-616, 2019.

SANDERS, Mary Ellen. Probiotics: considerations for human health. **Nutrition reviews**, v. 61, n. 3, p. 91-99, 2003.

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

SANTOS, E.K.R dos; AZOUBEL; P.M., GOUVEIA, E.R. Better Pectin Yield From Passion Fruit Peel (*Passiflora edulis* f. *flavicarpa*): From Shaker or Ultrasound? A Comparison. **Waste Biomass Valor**, p. 1-6, 2016.

SANTOS, R. T. S. et al. Physicochemical characterization, bioactive compounds, in vitro antioxidant activity, sensory profile and consumer acceptability of fermented alcoholic beverage obtained from Caatinga passion fruit (*Passiflora cincinnata* Mast.). **LWT**, v. 148, p. 111714, 2021.

SEIXAS, F. L.; FUKUDA, D. L.; TURBIANI, F. R. B. et al. Extraction of pectin from passion fruit peel (*Passiflora edulis* f. *flavicarpa*) by microwave-induced heating. **Food Hydrocolloids**, v. 38, p. 186 - 192, 2014.

SHARMA, Ruchi et al. Barley-based probiotic food mixture: health effects and future prospects. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, p. 1-15, 2021.

SIEBRA, A. L. A. et al. Potentiation of antibiotic activity by *Passiflora cincinnata* Mast. front of strains *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli*. **Saudi journal of biological sciences**, v. 25, n. 1, p. 37-43, 2018.

SILVA, S. G. et al. Physicochemical quality, bioactive compounds and in vitro antioxidant activity of a new variety of passion fruit cv. BRS Sertão Forte (*Passiflora cincinnata* Mast.) from Brazilian Semiarid region. **Scientia Horticulturae**, v. 272, p. 109595, 2020.

SINGH, Kuljit; RAO, Alka. Probiotics: A potential immunomodulator in COVID-19 infection management. **Nutrition Research**, v. 87, p. 1-12, 2021.

SINGLETON, Vernon L.; ORTHOFER, Rudolf; LAMUELA-RAVENTÓS, Rosa M. [14] Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of folin-ciocalteu reagent. In: **Methods in enzymology**. Academic press, p. 152-178, 1999.

SMITH, Nick W. et al. The classification and evolution of bacterial cross-feeding. **Frontiers in Ecology and Evolution**, v. 7, p. 153, 2019.

SOUZA, Renata Kelly Dias et al. Ethnopharmacology of medicinal plants of carrasco, northeastern Brazil. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 157, p. 99-104, 2014.

SUCCI, Mariantonietta et al. Bile salt and acid tolerance of *Lactobacillus rhamnosus* strains isolated from Parmigiano Reggiano cheese. **FEMS microbiology letters**, v. 244, n. 1, p. 129-137, 2005.

SWANSON, Kelly S. et al. The International Scientific Association for Probiotics and Prebiotics (ISAPP) consensus statement on the definition and scope of synbiotics. **Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology**, v. 17, n. 11, p. 687-701, 2020.

TACHEDJIAN, Gilda et al. The role of lactic acid production by probiotic *Lactobacillus* species in vaginal health. **Research in microbiology**, v. 168, n. 9-10, p. 782-792, 2017.

TARIFA, María C. et al. Symbiotic pectin microparticles with native Jerusalem artichoke (*Helianthus tuberosus* L.) enhance *Lactobacillus paracasei* subsp. *tolerans* survival. **Revista Argentina de Microbiología**, 2021.

TERPOU, Antonia et al. Probiotics in food systems: Significance and emerging strategies towards improved viability and delivery of enhanced beneficial value. **Nutrients**, v. 11, n. 7, p. 1591, 2019.

THAMER, Karime Gianetti; PENNA, Ana Lúcia Barretto. Caracterização de bebidas lácteas funcionais fermentadas por probióticos e acrescidas de prebiótico. **Food Science and Technology**, v. 26, p. 589-595, 2006.

TIAN, Lingmin et al. Effects of pectin on fermentation characteristics, carbohydrate utilization, and microbial community composition in the gastrointestinal tract of weaning pigs. **Molecular nutrition & food research**, v. 61, n. 1, p. 1600186, 2017.



TRINCHIERI, Vito et al. Exploiting Bacteria for Improving Hypoxemia of COVID-19 Patients. **Biomedicines**, v. 10, n. 8, p. 1851, 2022.

VALERO-CASES, Estefanía et al. Non-dairy fermented beverages as potential carriers to ensure probiotics, prebiotics, and bioactive compounds arrival to the gut and their health benefits. **Nutrients**, v. 12, n. 6, p. 1666, 2020.

VALERO-CASES, E.; FRUTOS, M. J. Effect of inulin on the viability of *L. plantarum* during storage and in vitro digestion and on composition parameters of vegetable fermented juices. **Plant Foods for Human Nutrition**, v. 72, n. 2, p. 161-167, 2017.

VALERO-CASES, Estefanía; NUNCIO-JÁUREGUI, Nallely; FRUTOS, María José. Influence of fermentation with different lactic acid bacteria and in vitro digestion on the biotransformation of phenolic compounds in fermented pomegranate juices. **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 65, n. 31, p. 6488-6496, 2017.

VANDENPLAS, Y.; HUYS, G.; DAUBE, G. Probiotics: an update. **Jornal de Pediatria**, v. 91, n.1, p. 6 - 21, 2015.

VIVAS, N.; AUGUSTIN, M.; LONVAUD-FUNEL, A. Influence of oak wood and grape tannins on the lactic acid bacterium *Oenococcus oeni* (*Leuconostoc oenos*, 8413). **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 80, n. 11, p. 1675-1678, 2000.

WANG, Yaqi et al. Metabolism characteristics of lactic acid bacteria and the expanding applications in food industry. **Frontiers in Bioengineering and Biotechnology**, v. 9, 2021.

WANG, Miaomiao et al. Characterization and functional properties of mango peel pectin extracted by ultrasound assisted citric acid. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 91, p. 794-803, 2016.

WANG, Pengkai et al. Preparação de pectinas aciladas com ácidos fenólicos por meio de reação catalisada por lipase e avaliação de seu desempenho de preservação. **LWT**, v. 147, p. 111615, 2021.

XU, Y.; ZHANG, L.; BAILINA, Y. et al. Effects of ultrasound and/or heating on the extraction of pectin from grapefruit peel. **Journal of Food Engineering**, v. 126, p. 72 – 81, 2014.

YANG, Jin-Shu; MU, Tai-Hua; MA, Meng-Mei. Extraction, structure, and emulsifying properties of pectin from potato pulp. **Food chemistry**, v. 244, p. 197-205, 2018.

ZHANG Y, LIN J AND ZHONG Q, S/O/W emulsions prepared with sugar beet pectin to enhance the viability of probiotic *Lactobacillus salivarius* NRRL B-30514. **Food Hydrocol**, 52: 804-810, 2016.