



**FERNANDA MARIA DE SOUSA**

**FORMULAÇÃO E TESTES DE FUNCIONALIDADE DE  
BEBIDA SIMBIÓTICA A BASE DE POLPA DE CAFÉ,  
AMÊNDOAS DE JERIVÁ E FARINHA DE YACON.**

**LAVRAS – MG**

**2022**

**FERNANDA MARIA DE SOUSA**

**FORMULAÇÃO E TESTES DE FUNCIONALIDADE DE  
BEBIDA SIMBIÓTICA A BASE DE POLPA DE CAFÉ,  
AMÊNDOAS DE JERIVÁ E FARINHA DE YACON.**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Alimentos, para obtenção do título de Mestre em Engenharia de Alimentos.

Profa. Dra. Olga Lucía Mondragón-Bernal

Orientadora

Prof. Dr. José Guilherme Lembi Ferreira Alves

Coorientador

**LAVRAS – MG**

**2022**

**Ficha catalográfica elaborada pelo Sistema de Geração de Ficha Catalográfica da Biblioteca  
Universitária da UFLA, com dados informados pelo(a) próprio(a) autor(a).**

Sousa, Fernanda Maria de.  
Formulação e testes de funcionalidade de bebida simbiótica a  
base de polpa de café, amêndoas de jerivá e farinha de yacon.

/Fernanda Maria de Sousa. - 2022.  
109 p.

Orientador(a): Olga Lucia Mondragón-Bernal.  
Coorientador(a): José Guilherme Lembi Ferreira Alves.  
Dissertação (mestrado acadêmico) - Universidade Federal de  
Lavras, 2022.  
Bibliografia.

1. Fermentação com probióticos. 2. Biotecnologia em  
fermentação de fontes vegetais. 3. Funcionalidade pós - bióticos,  
alimentos simbióticos. I. Mondragón-Bernal, Olga Lucia. II. Alves,

**FERNANDA MARIA DE SOUSA**

**FORMULAÇÃO E TESTES DE FUNCIONALIDADE DE  
BEBIDA SIMBIÓTICA A BASE DE POLPA DE CAFÉ,  
AMÊNDOAS DE JERIVÁ E FARINHA DE YACON.**

**FORMULATION AND FUNCTIONALITY TESTS OF  
SYMBIOTIC BEVERAGE BASED ON COFFEE PULP,  
JERIVAH ALMONDS AND YACON FLOUR**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Alimentos, para obtenção do título de Mestre em Engenharia de Alimentos.

APROVADA em 25 de fevereiro de 2022.  
Dra Olga Lucia Mondragón-Bernal UFLA  
Dr Evandro Galvão Tavares Menezes UFV  
Dr Flávio Meira Borém UFLA

**Profa Dra Olga Lucia Mondragón-Bernal  
Orientadora**

**Prof. José Guilherme Lembi Ferreira Alves  
Co-orientador**

**LAVRAS-MG**

**2022**

*À minha mãe Maria Helena pelo exemplo de força, por todo carinho  
e apoio em todas as etapas e por ser o meu maior exemplo de vida.*

*Ao meu pai José Francisco por ser minha base,  
minha referência para tudo na vida.*

*Dedico.*

## AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente à Deus por trilhar meu caminho e me dar sabedoria, força e saúde para viver toda experiência do mestrado.

À Universidade Federal de Lavras e a todos os professores do Programa de Mestrado em Engenharia de Alimentos da UFLA.

Um agradecimento especial aos meus orientadores Olga e José Guilherme, pelos profissionais e ainda mais seres humanos que são, sempre com muita paciência e atenção na condução do experimento, além do cuidado com seus orientados, vocês são exemplos e tenho um grande carinho por vocês.

À minha família, especialmente meus pais José Francisco e Maria Helena, por ser minha base de sustentação em todos os meus planos, sempre me apoiando e possibilitando caminhar para frente, abrindo todas as portas possíveis e me proporcionando sempre a melhor experiência de vida que possam me dar.

À minha irmã Fátima, uma das primeiras pessoas a me apoiar e incentivar a viver essa experiência, quem eu carrego comigo dentro do meu coração por onde eu caminhar.

Ao meu parceiro de vida William Simões, por toda a parceria, incentivo, cumplicidade, força e paciência dada no percurso todo, você foi peça fundamental, meu amor e admiração por você serão eternos.

Aos meus amigos que a UFLA trouxe, especialmente Matheus Felipe, peça chave para impulsionar meu desenvolvimento pessoal e no experimento, pois me ajudou muito em todos os sentidos, seu apoio nunca será esquecido, vou te levar sempre na memória.

A minha amiga da vida Bruna Guedes, que mesmo estando longe se fez presente em várias etapas dessa minha experiência, dando muito apoio e forças especialmente nas horas difíceis, meu amor por você é para vida toda.

Muito obrigada!

*“Escreva algo que valha a pena ler ou faça algo que valha a pena escrever”.*

*(Benjamin Franklin).*

## RESUMO

Devido à crescente demanda por alimentos benéficos a saúde e ainda com baixo impacto ambiental, a indústria do ramo fermentativo vem apostando em estudos que envolvam fontes vegetais alternativas como resíduos de processamento agrícola, exemplo a polpa do café, e PANC's (Plantas Alimentícias Não Convencionais), como as amêndoas do jerivá. O objetivo deste projeto foi otimizar o processo de fermentação de meio à base de extratos da polpa de café arábica (EPC), amêndoas do jerivá (EAJ) e farinha de yacon (FrY) com probióticos, através de uma estratégia sequencial de planejamentos aplicando inicialmente o Plackett e Burman e em seguida o DCCR (Delineamento Composto Central Rotacional). Foram fermentados 50 mL de diferentes formulações em triplicata com *Lactobacillus rhamnosus* e *Bifidobacterium longum* a 37°C em anaerobiose, conduzidas até pH≈4,5 para obtenção de uma bebida sensorialmente equilibrada. Após análise por Plackett e Burman, concluiu-se que, as variáveis independentes mais importantes foram EPC e FrY, por diminuírem o tempo de fermentação da bebida simbiótica (t≈20h), com bom crescimento celular (≈5 LogUFC.mL<sup>-1</sup>), consumo de açúcares totais (C<sub>AT</sub>) e redutores (C<sub>AR</sub>) (máx=68,0 g/L e 43,2 g/L, respectivamente), produção de exopolissacarídeos (máx=0,9 g/L) e ácidos orgânicos (máx= 1,08g/L). Os resultados do DCCR indicaram que as variáveis respostas Tempo; CrescTotal; CrescLR; CrescBL; C<sub>AT</sub>; P<sub>AT</sub> e Parâmetros de cor L\*, a\*, b\* apresentaram bom ajuste do modelo a 95% de confiança (p<0,05). Os melhores protótipos de bebida simbiótica continham de 10 a 14 % m/v de Farinha de Yacon, 8 a 16 % v/v de extrato de polpa de café, 5% v/v de extrato de polpa de café funcional e 17,5% v/v de extrato de amêndoas de jerivá, com as melhores contagens de células (≈13 LogUFC.mL<sup>-1</sup>). Através da validação dos modelos nessas condições, foi possível prever o tempo de fermentação (em torno de 20h) e os CresTotal (em torno de 5,1 Log UFC.mL<sup>-1</sup>); CrescLR (em torno de 5,3 LogUFC.mL<sup>-1</sup>) e CrescBL (em torno de 5,02 LogUFC.mL<sup>-1</sup>). Dos tratamentos do DCCR, o que apresentou maior produção de ácido láctico (5,3 g/L) (HPLC) e maior concentração de células vivas (48,45%) (Citometria de Fluxo) ao final da fermentação foi o Tratamento 4, (22,1% m/v de FrY e 25,6% v/v de EPC), sendo identificados compostos pós-bióticos em todos os tratamentos avaliados com máximo de 26,15% no Tratamento 5 (5 % m/v de FrY e 15 % v/v de EPC), o que garante funcionalidades a bebida. Dos testes funcionais *in vitro* notou-se maiores contagens de probióticos nas primeiras 3 horas de digestão (8,1 LogUFC.mL<sup>-1</sup>) com queda drástica após 4 horas de digestão (5,5 LogUFC.mL<sup>-1</sup>) e a capacidade de aderência das células ao tecido linfóide associado ao intestino variaram de baixa (%H=32,07 Tratamento 1 da Validação) a média (%H=39,31 do Tratamento 2 da Validação).

Palavras-chave: Probióticos; Fermentação de Extratos Vegetais; *Lactobacillus rhamnosus*; *Bifidobacterium longum*.



## ABSTRACT

Due to the growing demand for foods that are beneficial to health and with low environmental impact, the fermentation industry has been betting on studies involving alternative plant sources such as agricultural processing residues, such as coffee pulp, and PANC's (Unconventional Food Plants), like jerivá almonds. The objective of this project was to optimize the fermentation process of a medium based on extracts of arabica coffee pulp (EPC), jerivá almonds (EAJ) and yacon flour (FrY) with probiotics, through a sequential planning strategy applying initially the Plackett and Burman and then the DCCR (Central Composite Rotational Design). 50 mL of different formulations were fermented in triplicate with *Lactobacillus rhamnosus* and *Bifidobacterium longum* at 37°C in anaerobic conditions, brought to pH≈4.5 to obtain a sensorially balanced drink. After analysis by Plackett and Burman, it was concluded that the most important independent variables were EPC and FrY, as they reduced the fermentation time of the symbiotic drink (t≈20h), with good cell growth (≈5 LogUFC.mL<sup>-1</sup>), consumption of total (CAT) and reducing (CAR) sugars (max=68.0 g/L and 43.2 g/L, respectively), production of exopolysaccharides (max=0.9 g/L) and organic acids (max=1.08g/L). The DCCR results indicated that the response variables Time; TotalGrow; GrowLR; GrowBL; CAT; PAT and Color parameters L\*, a\*, b\* showed a good fit of the model at 95% confidence (p<0.05). The best prototypes of symbiotic drink contained 10 to 14 % w/v of Yacon Flour, 8 to 16 % v/v of coffee pulp extract, 5% v/v of functional coffee pulp extract and 17.5 % v/v of jerivá almond extract, with the best cell counts (≈13 LogUFC.mL<sup>-1</sup>). By validating the models under these conditions, it was possible to predict the fermentation time (around 20h) and CresTotal (around 5.1 Log CFU.mL<sup>-1</sup>); CrescLR (around 5.3 LogUFC.mL<sup>-1</sup>) and CrescBL (around 5.02 LogUFC.mL<sup>-1</sup>). Of the DCCR treatments, the one that showed the highest production of lactic acid (5.3 g/L) (HPLC) and the highest concentration of live cells (48.45%) (Flow Cytometry) at the end of fermentation was Treatment 4, (22.1% m/v of FrY and 25.6% v/v of EPC), with postbiotic compounds being identified in all treatments evaluated with a maximum of 26.15% in Treatment 5 (5% m/v of FrY and 15 % v/v EPC), which guarantees beverage functionality. In vitro functional tests showed higher probiotic counts in the first 3 hours of digestion (8.1 LogUFC.mL<sup>-1</sup>) with a drastic drop after 4 hours of digestion (5.5 LogUFC.mL<sup>-1</sup>) and the ability to Cell adherence to gut-associated lymphoid tissue ranged from low (%H=32.07 Treatment 1 of Validation) to medium (%H=39.31 of Treatment 2 of Validation).

Keywords: Probiotics; Fermentation of Vegetable Extracts; *Lactobacillus rhamnosus*; *Bifidobacterium longum*.

## LISTA DE FIGURAS

### **CAPÍTULO 1 FORMULAÇÃO E TESTES DE FUNCIONALIDADE DE BEBIDA SIMBIÓTICA A BASE DE POLPA DE CAFÉ, AMÊNDOAS DE JERIVÁ E FARINHA DE YACON.**

Figura 1 - Principais fatores que afetam a viabilidade dos probióticos desde a produção do	21
Figura 2 - Benefícios à saúde e modos de ação dos probióticos e pós-bióticos.....	22
Figura 3 - Vias metabólicas das bactérias do ácido láctico.....	26
Figura 4 - Alguns pós-bióticos e seus possíveis efeitos positivos locais e sistêmicos no hospedeiro.....	29
Figura 5 - Cocos da palmeira de Jerivá. ....	31
Figura 6 - Subprodutos gerados do processamento do café .....	32
Figura 7 - Batata yacon.....	35
Figura 8 - Configurações de um citômetro de fluxo.....	36
Figura 9 - Diagrama esquemático do princípio de detecção para contagem de bactéria do ácido láctico viva/morta em produtos contendo probióticos utilizando a citometria de fluxo de alta sensibilidade construída em laboratório. ....	38
Figura 10 - Gráficos de multiparâmetros obtidos após dupla coloração PI/CFDA de células de <i>B. bifidum</i> antes (A) e após liofilização (B). Com Q1: bactérias mortas coradas; Q2: bactérias lesadas coradas; Q3: células não coradas e Q4: bactérias vivas coradas.....	38

### **CAPÍTULO 2 FORMULAÇÃO E TESTES DE FUNCIONALIDADE DE BEBIDA SIMBIÓTICA A BASE DE POLPA DE CAFÉ, AMÊNDOAS DE JERIVÁ E FARINHA DE YACON.**

Figura 1 - Curvas de contorno para Tempo (a); CrescTotal (b); CrescLR (c); CrescBL (d); $C_{AT}$ (e); $P_{AT}$ (f); $L^*$ (g); $a^*$ (h) e $b^*$ (i) .....	75
Figura 2 - Cromatograma do tratamento 1, tempo inicial, repetição 1 (a); Cromatograma do tratamento 1, tempo final, repetição 1 (b) .....	81
Figura 3 - Cromatograma do tratamento 4, tempo inicial, repetição 1 (a); Cromatograma do tratamento 4, tempo final, repetição 1(b) .....	82
Figura 4 - : Distribuição de células nos 4 quadrantes do histograma no tempo final de fermentação para Tratamento 1 (a); Tratamento 2 (b); Tratamento 3 (c); Tratamento 4 (d); Tratamento 5 (e) e Tratamento 6 (f) .....	84
Figura 5 - Distribuição de células nos 4 quadrantes do histograma para as três repetições do tempo inicial do Tratamento 2 (a) e do tempo final do Tratamento 2 (b). ....	88

## LISTA DE TABELAS

### **CAPÍTULO 1 FORMULAÇÃO E TESTES DE FUNCIONALIDADE DE BEBIDA SIMBIÓTICA A BASE DE POLPA DE CAFÉ, AMÊNDOAS DE JERIVÁ E FARINHA DE YACON.**

Tabela 1 - Composição aproximada das amêndoas de Jerivá ..... 32

Tabela 2 - Composição química da polpa do café..... **Erro! Indicador não definido.**

Tabela 3 - Composição centesimal do Yacon *in natura* (base úmida)..... 35

### **CAPÍTULO 2 FORMULAÇÃO E TESTES DE FUNCIONALIDADE DE BEBIDA SIMBIÓTICA A BASE DE POLPA DE CAFÉ, AMÊNDOAS DE JERIVÁ E FARINHA DE YACON.**

Tabela 1 - Relação entre os níveis codificados e reais das variáveis independentes no delineamento Plackett e Burman ..... 55

Tabela 2 - Relação entre valores codificados e reais das variáveis independentes utilizadas no DCCR ..... 56

Tabela 3 - Composição em base integral dos extratos de polpa de café, amêndoas de jerivá e farinha de yacon..... 63

Tabela 4 - Resultados dos ensaios do planejamento experimental PB 12..... 64

Tabela 5 - Estimativa de efeitos para CrsLR ( $\text{LogUFC.mL}^{-1}$ ), CresBL ( $\text{LogUFC.mL}^{-1}$ ), C<sub>AR</sub> (g/L), P<sub>EPS</sub> (g/L) e P<sub>AT</sub> (g/L) no PB12 ..... 66

Tabela 6 - Resultados dos ensaios do Delineamento Composto Central Rotacional (DCCR). 69

Tabela 7 - Coeficientes de regressão,  $r^2$  e *p-valor* gerados a partir das análises sobre tempo; CrsTotal; CrsLR; CrsBL; C<sub>AT</sub> e C<sub>AR</sub> ..... 72

Tabela 8 - Coeficientes de regressão,  $r^2$  e *p-valor* gerados a partir das análises sobre P<sub>EPS</sub>; P<sub>AT</sub>; L\*, a\*, b\* e Turbidez Final..... 72

Tabela 9 - Análise de variância ANOVA para as respostas Tempo; CrescTotal; CrescBL; CrescLR; C<sub>AT</sub>; P<sub>AT</sub> e Parâmetros de cor L\*, a\*, b\* ..... 73

Tabela 10 - Formulações utilizadas para validação dos modelos..... 78

Tabela 11 - Validação dos modelos; valores experimentais e preditos e desvios relativos ..... 79

Tabela 12 - Produção de ácidos: lático e acético no DCCR..... 79

Tabela 13 - Média de porcentagem de distribuição do tempo final de fermentação (tf) para cada quadrante dos Tratamentos 1,2,3,4,5 e 6. .... 86

Tabela 14 - Média das contagens totais e de células não viáveis ( $\text{LogUFC.mL}^{-1}$ ) no tempo final de fermentação para os tratamentos possíveis de serem avaliados em Citometria de Fluxo. .. 86

Tabela 15 - Resultados das CT ( $\text{LogUFC.mL}^{-1}$ ) das bactérias presentes nos dois tratamentos estudados durante as 8 horas de digestão do trato gastrointestinal *in vitro* ..... 90

Tabela 16 - Resultados das Médias de %Hidrofobicidade das linhagens puras, inóculo e tratamentos da validação dos modelos no tempo final de fermentação 92

Tabela 17 - Tempo e Velocidade de injeção no sistema cromatográfico ..... 100

Tabela 18 - Resultados da concentração de células vivas, mortas, injuriadas e não marcadas dos tratamentos 7, 8 e 9 de tempo final do DCCR..... 105

## SUMÁRIO

### **CAPÍTULO 1 FORMULAÇÃO E TESTES DE FUNCIONALIDADE DE BEBIDA SIMBIÓTICA A BASE DE POLPA DE CAFÉ, AMÊNDOAS DE JERIVÁ E FARINHA DE YACON.**

1. INTRODUÇÃO.....	15
2. OBJETIVOS.....	17
2.1. Objetivo Geral.....	17
2.2. Objetivos Específicos.....	17
3. REFERENCIAL TEÓRICO.....	17
3.1. Alimentos Funcionais.....	17
3.2. Probióticos.....	19
3.3. Probióticos e seus efeitos sobre a saúde.....	21
3.4. Prebióticos.....	23
3.5. Alimentos Simbióticos.....	23
3.6. Fermentação Lática e Bactérias do Ácido Lático.....	25
3.7. Bifidobactérias.....	27
3.8. Pos-Bióticos.....	28
3.9. Jerivá ( <i>Syagrus romanzoffiana</i> ).....	31
3.10. Café ( <i>Coffea arábica</i> ) e Aplicabilidade da Polpa.....	32
3.11. Yacon ( <i>Smallanthus sonchifolius</i> ).....	34
3.12. Citometria De Fluxo.....	35
4. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	39

### **CAPÍTULO 2 FORMULAÇÃO E TESTES DE FUNCIONALIDADE DE BEBIDA SIMBIÓTICA A BASE DE POLPA DE CAFÉ, AMÊNDOAS DE JERIVÁ E FARINHA DE YACON.**

1. INTRODUÇÃO.....	51
2. MATERIAL E MÉTODOS.....	51
2.1. Preparo e caracterização centesimal das matérias primas.....	53
2.2. Linhagens probióticas e Preparo do inóculo.....	54
2.3. Fermentações e Planejamento Experimental.....	54
2.4. Delineamento Experimental DCCR.....	55
2.5. Medida do pH, Acidez titulável (AT) e Produção de Ácidos Totais (P <sub>AT</sub> ).....	57
2.6. Contagem Padrão em Placas e Crescimento Celular.....	57
2.7. Determinação de Açúcares Totais (AT), Açúcares Redutores (AR) e Consumo de Açúcares (C <sub>AT</sub> e C <sub>AR</sub> ).....	57
2.8. Determinação do teor de Exopolissacarídeos (EPS) e Produção de EPS (P <sub>EPS</sub> ).....	58
2.9. Determinação dos parâmetros de cor L*, a*, b*.....	58
2.10. Determinação da Turbidez.....	58
2.11. Determinação de ácidos por HPLC.....	59
2.12. Estudo da viabilidade celular por Citometria de Fluxo.....	59
2.13. Avaliações Funcionais.....	60
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	63
3.1. Caracterização centesimal das matérias primas.....	63

3.2. Delineamento experimental Plackett e Burman 12 (PB12) para análise de variáveis significativas na formulação da bebida funcional. ....	63
3.3. DCCR .....	67
3.4. Validação dos Modelos .....	78
3.5. Análise de ácidos orgânicos na bebida simbiótica.....	79
3.6. Avaliação da proporção de bactérias vivas, mortas e injuriadas por Citometria de Fluxo.....	82
3.7. Resultados das Avaliações Funcionais .....	89
4. CONCLUSÃO.....	93
5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	94

# **CAPÍTULO 1**

## 1. INTRODUÇÃO

Devido à crescente demanda atual dos consumidores por alimentos capazes de gerar benefícios a sua saúde, as indústrias dos mais diversos setores do ramo têm voltado sua atenção ao desenvolvimento de produtos saudáveis, como os alimentos funcionais. Esta iniciativa é ainda endossada pela diversificação do atual mercado brasileiro devido a geração de diferentes segmentos de consumidores com preferências mais restritas quanto aos alimentos que ingerem, como os veganos e vegetarianos que se abstêm do consumo de alimentos de origem animal.

Alimentos funcionais, além de promover efeitos nutricionais básicos, também geram benefícios à saúde humana, como é o caso dos alimentos simbióticos (Finley, 2009; Balthazar et al., 2017). Simbióticos ou Synbiotics (Syn=sinergismo; Biotec=para vida), contém microrganismos probióticos e ingredientes prebióticos, sendo os prebióticos responsáveis por estimular o desenvolvimento e aumento da viabilidade dos microrganismos, promovendo efeito sinérgico entre probióticos e prebióticos (Panesar et al., 2009).

Segundo relatórios da FAO/OMS (2002) os probióticos são microrganismos vivos capazes de gerar benefícios a saúde do consumidor. Dentre eles estão as bactérias do ácido láctico como os lactobacilos e bifidobactérias muito aplicadas no desenvolvimento de alimentos simbióticos. Os prebióticos são ingredientes dificilmente digeridos pelo intestino humano capazes de estimular o desenvolvimento de bactérias benéficas que habitam o trato gastrointestinal, além de servirem de substitutos ao uso de açúcar devido ao seu sabor doce.

Nos últimos anos pesquisas voltadas a investigação da funcionalidade de alimentos simbióticos indicam haver benefícios clínicos sobre a ingestão não somente dos microrganismos viáveis, mas também dos metabólitos ou componentes da parede celular gerados por estes microrganismos, os pós-bióticos. Alguns autores definem os pós-bióticos como sendo endo e exopolissacarídeos, ácidos graxos de cadeia curta, proteínas da parede celular, algumas vitaminas, ácidos orgânicos e etc. capazes de gerar benefícios a saúde (Lee et al., 2002; Oberg et al., 2011; Konstantinov et al., 2013; Tsilingiri & Rescigno, 2013; Tomar et al., 2015; George et al., 2018; Adebayo-Tayo et al., 2018; Lukic et al., 2018).

Estudos sobre o potencial de fermentação com probióticos de fontes vegetais alternativas às fontes lácteas, vem sendo feitos com o intuito de gerar novos produtos; atender as necessidades do mercado consumidor cada vez mais diversificado e agregar valor às fontes estudadas (Mondragón-Bernal, 2004; Prado et al., 2008; Mondragón-Bernal 2009; Mondragón-

Bernal et al., 2010; Nicolesco & Buruleanu, 2010; Nualkaekul & Charalampopoulos (2011); Pereira et al., 2011; Sheela & Suganya (2012); Martins et al., 2013; Wang et al., 2017; Mondragón-Bernal et al., 2017; Evangelista et al., 2017; Teixeira, 2017; Hernández-Torres, 2019).

O Brasil é o maior produtor e exportador de café (*Coffea arabica*) e a região Sul de Minas Gerais é a maior produtora do país. Sua indústria libera enormes quantidades de subprodutos (cerca de 15 milhões de toneladas segundo levantamentos de Pleissner et al., 2016), ricos em carboidratos e proteínas o que vem estimulando seu emprego em diversos estudos que envolvem processos fermentativos (Sera, 2010; Menezes et al., 2013a; Menezes et al., 2013b; Nurfeta, 2010; Murthy & Naidu, 2011; Torres-Macera et al., 2011; Nogueira et al., 2011; Velazquez-Mancera et al., 2011; Bhoite & Murthy, 2014; Murthy & Naidu, 2012; Pleissner et al., 2016; Gurram et al., 2016).

O fruto jerivá (*Syagrus romanzoffiana*) é uma PANC (Planta alimentícia não convencional) nativa brasileira abundante na região de Minas Gerais e sua amêndoa vem sendo explorada quanto a sua composição nutricional comprovando seu elevado teor de proteínas e outros compostos nutricionais (Coimbra & Jorge, 2016; Silva et al., 2016; Magalhães et al., 2020). Nenhum estudo abordou até hoje seu emprego em processos fermentativos, tornando-o interessante para ser aqui abordado.

O yacon (*Smallanthus sonchifolius*) é segundo alguns autores é uma fonte particularmente abundante de prebióticos (Pedreschi et al., 2003; Ojansivu, et al., 2011), o que explica sua crescente aplicação no desenvolvimento de alimentos simbióticos (Delgado et al., 2010; Moura et al., 2012; Rodrigues et al., 2012; Padilha et al., 2017; Hernández-Torres, 2019).

Desta forma justifica-se o emprego da polpa de café, amêndoas de jerivá e farinha de yacon na elaboração de uma nova bebida simbiótica como principal objetivo deste projeto. De maneira geral, espera-se obter uma bebida simbiótica com características físico-químicas que promovam equilíbrio simbiótico e sinérgico entre as matérias-primas e bactérias empregadas, gerando um meio balanceado nutricionalmente e que garanta funcionalidade ao produto elaborado.



## **2. OBJETIVOS**

### **2.1. Objetivo Geral**

Elaborar uma bebida simbiótica fermentada a base de extratos da polpa de café (*Coffea arabica*), amêndoas de jerivá (*Syagrus romanzoffiana*) e farinha de yacon (*Smallanthus sonchifolius*) por *Lactobacillus rhamnosus* (LR32) e *Bifidobacterium longum* (BL04), com capacidade funcional.

### **2.2. Objetivos Específicos**

- Caracterização centesimal das matérias-primas (extratos da polpa café, amêndoas de jerivá e farinha de yacon) e avaliação de sua aplicação em processos de fermentação com probióticos;
- Otimização da formulação do meio de fermentação e da proporção dos microrganismos para elaboração de bebida simbiótica por um planejamento experimental sequencial Plackett-Burman (PB 12) e Delineamento Composto Central Rotacional (DCCR);
- Avaliação da concentração de células viáveis, inviáveis e injuriadas presentes no meio de fermentação aplicando a técnica de leitura em Citômetro de Fluxo, possibilitando discussões sobre os pós-biótico;
- Demonstração da capacidade funcional das bactérias probióticas através de estudos *in vitro* para os melhores protótipos.

## **3. REFERENCIAL TEÓRICO**

### **3.1. Alimentos Funcionais**

O termo “alimento funcional” foi usado pela primeira vez em 1984 no Japão como resultado de um estudo sobre relações entre nutrição, satisfação sensorial, fortificação e modulação de sistemas fisiológicos para definir aqueles produtos alimentícios fortificados com constituintes especiais que possuem efeitos fisiológicos vantajosos (Bigliardi & Galati, 2013).

Os alimentos funcionais podem ser definidos como alimentos comuns, com componentes fisiologicamente ativos que promovem benefícios para a saúde além da nutrição básica, estando relacionados à redução do risco da manifestação de certas doenças, não podendo ser considerados medicamentos, uma vez que os princípios responsáveis pelos efeitos benéficos não são extraídos do alimento. Pode ser considerado um alimento: natural; ao qual um componente foi adicionado; do qual um componente foi removido; onde um ou mais componentes foram modificados; no qual a biodisponibilidade foi modificada ou qualquer dessas combinações (Finley, 2009).

O crescente conhecimento sobre o impacto positivo da dieta na saúde humana deu início a uma nova era extraordinária de novos ingredientes e produtos alimentícios funcionais e tem impulsionado a pesquisa sobre os efeitos fisiológicos de componentes de alto valor biológico de origem natural (Matos & Cardoso, 2017). Portanto os alimentos funcionais têm sido associados à promoção de boa saúde; melhoria do bem-estar; qualidade de vida e redução no risco de doenças.

A legislação brasileira para alimentos funcionais é regulamentada pela ANVISA (Agência Nacional de Vigilância Sanitária) através das resoluções RDC nº18 e 19 datadas de abril de 1999, da RDC nº2 datada de janeiro de 2002 e da lista de alimentos com alegações de propriedades funcionais e/ou de saúde, novos alimentos/ingredientes, substâncias bioativas e probióticos aprovada em julho de 2008. As alegações são aprovadas para o produto final que contenha os ingredientes ou componentes funcionais com base em evidências científicas, analisadas caso a caso, considerando a formulação e as características do alimento (ANVISA, 1999a; 1999b; 2002; 2008).

Os principais macro e micronutrientes cujas propriedades fisiológicas-funcionais têm sido demonstradas são os probióticos, prebióticos, ácidos graxos poli-insaturados ômega 3 e 6, vitaminas antioxidantes como a vitamina E, carotenoides, flavonoides, fibras alimentares, etc. Vale ressaltar que tais substâncias devem estar presentes nos alimentos em quantidades suficientes para produzir o efeito fisiológico desejado (Staliano, 2012).

Alimentos e bebidas naturalmente fermentados contêm microrganismos funcionais e não funcionais. Microrganismos funcionais transformam os constituintes químicos de matérias-primas aumentando a biodisponibilidade de nutrientes benéficos. As propriedades funcionais de microrganismos em alimentos fermentados incluem: propriedades antimicrobianas por produção de bacteriocina e nisina; propriedade antioxidante por atividade sequestradora de radicais livres; produção de peptídeos bioativos com propriedades imunomoduladores, antitrombicas e anti-hipertensivas; produção de enzimas; degradação de compostos antinutritivos em produtos consumíveis; síntese de ácido orgânico e peróxido de hidrogênio;

síntese de nutrientes como vitaminas, aminoácidos essenciais e compostos bioativos; dentre outras propriedades (Tamang et al., 2016).

Alimentos funcionais contendo prebióticos e probióticos fazem parte de um novo nicho de mercado que busca o reconhecimento, a satisfação e a aceitação do consumidor. Eles têm atraído o interesse da indústria alimentícia por razões econômicas e devido a evidências científicas relacionadas a seus benefícios para a saúde (Balthazar et al., 2017).

### **3.2. Probióticos**

Segundo relatórios da FAO/OMS (2002), os probióticos são definidos como microrganismos vivos que, quando administrados em quantidades adequadas, conferem benefícios à saúde do hospedeiro, através de uma ação positiva sobre a microbiota intestinal. Um microrganismo é considerado probiótico se for habitante normal do trato gastrointestinal, sobreviver à passagem pelo estômago e manter sua viabilidade e atividade no intestino produzindo substâncias antimicrobianas, por exemplo, as bacteriocinas (Ejtahed et al., 2011; Lollo et al., 2013; Nabavi et al., 2014; Puupponen-Pimia et al., 2002). Apesar de não ser uma idéia nova, a comercialização de alimentos probióticos tem aumentado significativamente (Wane, 2016).

De forma geral, os produtos que contêm microrganismos probióticos devem conter um número mínimo de células viáveis entre  $10^6$  e  $10^8$  unidades formadoras de colônia por grama de produto final (UFC/g). A legislação brasileira recomenda uma dose mínima de probióticos entre  $10^8$  e  $10^9$  UFC/porção diária do produto, para obter os efeitos benéficos à saúde (ANVISA, 2008).

Para que um microrganismo seja considerado cultura probiótica, deve satisfazer os seguintes critérios: i) Ser de origem humana e isolada de seu trato gastrointestinal, para que seja segura ao consumo humano; ii) Serem reconhecidas como seguras (GRAS-*generally recognised as safe*) para o consumo humano; iii) Sua produção em alta escala deve ser possível e os microrganismos devem estar viáveis e ativos nos veículos (alimentos) em que são incorporados; iv) Devem ser resistentes ao suco gástrico e intestinal e pH baixo do organismo do hospedeiro; v) Devem aderir às células intestinais e mucosa intestinal humana, permitindo sua manutenção e crescimento no intestino, favorecendo a exclusão competitiva de potenciais patógenos da mucosa do intestino; vi) Devem produzir substâncias antimicrobianas contra patógenos intestinais; vii) Devem ser seguros quando ingeridos através do consumo de

alimentos e durante uso clínico, mesmo em indivíduos imunocomprometidos; viii) Devem ter sua segurança e eficácia estabelecida através de ensaios clínicos controlados por placebo; ix) Devem ser capazes de produzir substâncias tais como bacteriocinas, ácidos orgânicos, diacetil ou peróxido de hidrogênio com atividade antagônica contra potenciais patógenos (PRESTI et al., 2015).

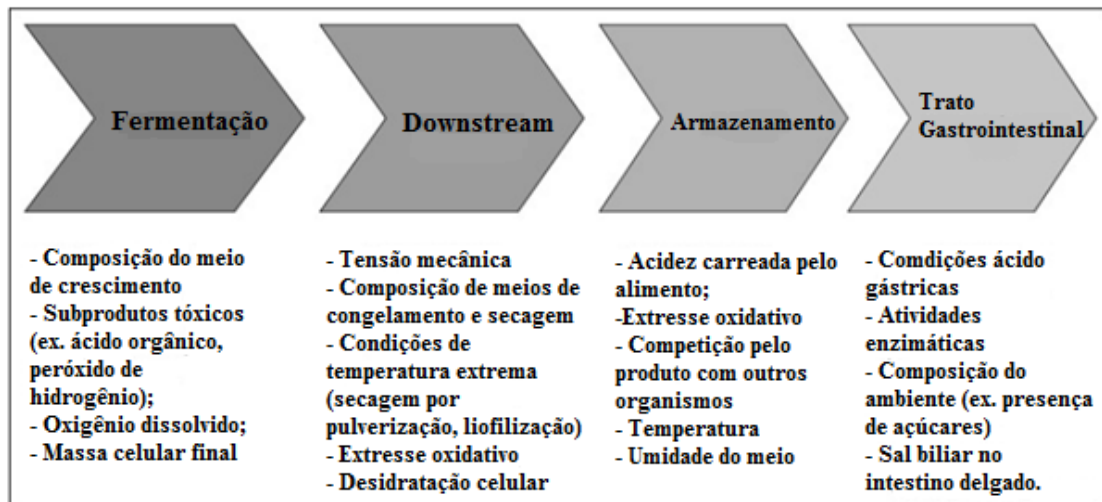
Entre os microrganismos com propriedades probióticas estão as bactérias lácticas, como *Lactobacilos*, *Bifidobactérias* e *Enterococos*. Dentre as espécies de lactobacilos e bifidobactérias mais empregadas, destacam-se: *Lactobacillus acidophilus*, *L. casei*, *L. casei* spp. *ramnosus*, *L. lactis*, *L. paracasei*, *L. plantarum*, *Bifidobacterium adolescentes*, *B. animalis*, *B. breve*, *B. bifium*, *B. infantis*, *B. lactis*, *B. longum*, etc. (Hage et al., 2017).

É de suma importância que a cepa probiótica sobreviva ao local onde se presume estar ativa. Para atividade máxima, a cepa deve ser capaz de proliferar e colonizar neste local específico. Além disso, também deve ser tolerado pelo sistema imunológico. Para uma aplicação bem-sucedida em alimentos, o probiótico deve ser tecnologicamente compatível com o processo de fabricação de alimentos. Além disso, os alimentos que contêm as bactérias probióticas devem manter os atributos sensoriais característicos dos alimentos tradicionais (Nagpal et al., 2012).

Das contribuições da composição do alimento para a funcionalidade probiótica, uma consideração importante é a presença de ingredientes bioativos, que podem fornecer benefícios independentes ou aumentar ou diminuir a eficácia dos probióticos. Estes ingredientes podem ser adicionados ou estar naturalmente presentes no alimento. Tais ingredientes podem incluir prebióticos, outras fibras, enzimas, vitaminas, minerais ou conservantes (Sanders & Marco, 2010). Além de fontes de carbono, as bactérias probióticas podem ser particularmente exigentes em aminoácidos, vitaminas e minerais para se desenvolverem em meio a matriz alimentar em que são inseridas (Espírito-Santo et al., 2014).

A viabilidade dos probióticos é um parâmetro fundamental, além também dos novos conceitos que vem agregando funcionalidade aos alimentos probióticos como os paraprobióticos e os pós-bióticos. Vários fatores ilustrados na Figura 1 afetam a viabilidade das bactérias probióticas até que elas atinjam o local de destino do hospedeiro. A demanda industrial por novas tecnologias que possibilitam um alto rendimento celular em larga escala que garantem a estabilidade probiótica dos alimentos permanece forte, porque muitas cepas de origem intestinal são difíceis de propagar (Lacroix & Yildirim, 2007).

Figura 1 - Principais fatores que afetam a viabilidade dos probióticos desde a produção do alimento até o trato gastrointestinal.



Fonte: Lacroix & Yildirim (2007).

### 3.3. Probióticos e seus efeitos sobre a saúde

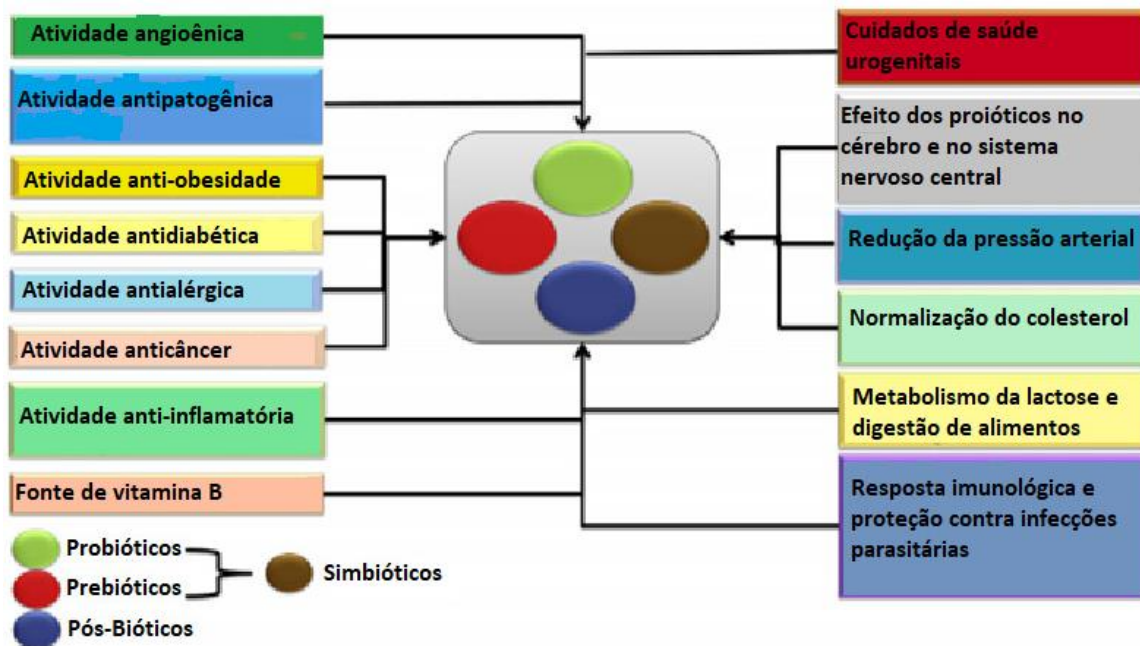
Uma consideração ecológica da microbiota intestinal humana é necessária para compreender a relevância na ação dos microrganismos probióticos na saúde humana. Cada indivíduo apresenta contagem de bactérias no total entre  $10^{15}$ - $10^{20}$  UFC/mL, sendo que as células bacterianas compreendem metade do peso úmido do material do cólon e seus números excedem em 10 vezes o número de células do tecido que formam o corpo humano e a população microbiana total no colón intestinal é cerca de  $10^{11}$  e  $10^{12}$  UFC/g (Aziz, et al., 2013).

Em muitos casos clínicos, ocorrem desequilíbrio nas densidades populacionais da microbiota intestinal (disbiose) e isso resulta em um supercrescimento de microrganismos patogênicos (Daliri & Lee, 2015). A microbiota intestinal pode perder sua homeostase por diversos fatores endógenos e exógenos, tais como composição da dieta, estilo de vida, envelhecimento, desordens peristálticas, câncer, cirurgias, doenças hepáticas ou renais, entre outros. Eubiose significa ação, processo ou condição de bem viver. As culturas probióticas são a chave para restabelecer a eubiose quando ocorre desequilíbrio por fatores adversos (Antunes et al., 2007).

O uso de probióticos para benefícios clínicos à saúde é uma área fascinante de pesquisa que a era atual ainda precisa explorar. Algumas das propriedades dos probióticos, tais como anti-patogenicidade, anti-diabético, anti-obesidade, anti-inflamatório, anti-câncer e anti-alérgicas e seu efeito sobre o cérebro e sistema nervoso central são relatados. A Figura 2

representa esquematicamente alguns das principais aplicações e forma de ação dos probióticos sobre a saúde humana (George et al., 2018). Os probióticos interagem com o hospedeiro humano em três níveis diferentes da parte inferior do trato gastrointestinal (TGI) humano: camada de muco, camada epitelial e tecido linfoide associado ao intestino (GALT) (Delgado et al., 2017).

Figura 2 - Benefícios à saúde e modos de ação dos probióticos e pós-bióticos.



Fonte: George et al. (2018).

A atividade antipatogênica é considerada como um dos efeitos mais benéficos dos probióticos porque, ao contrário dos antibióticos clássicos, a perturbação ou alteração na composição da população complexa da microbiota intestinal é inibida. Baseado em mecanismos elucidados pelo papel benéfico das cepas comerciais e probióticas, torna-se claro que tais cepas fornecem resistência à colonização por patógeno através de dois mecanismos: O antagonismo direto e os efeitos indiretos contra os patógenos (Tomar et al., 2015).

Levantamentos de George et al., 2018 demonstram que pesquisadores fizeram progressos na compreensão da importância dos probióticos na cura da diabetes; perda de peso; atividade anti-inflamatória (principalmente relacionado a cepas bacterianas probióticas geneticamente capazes de produzir e descarregar imunomoduladores); efeito anti-carcinogênico; prevenção de distúrbios associados a alergia; estimulação da produção do hormônio serotonina muito importante na regulação do humor, sono, apetite e ritmo cardíaco, dentre outras funções. Muitos estudos desenvolvidos com o passar dos anos foram bem-sucedidos em reproduzir resultados

que mostraram reduções significativas na lipoproteína de baixa densidade (LDL) e no colesterol total com o consumo de probióticos (Thushara et al., 2016).

### **3.4. Prebióticos**

Os prebióticos são definidos como ingredientes alimentares não digeríveis, seletivamente fermentáveis que permitem modificações específicas na composição e/ou na atividade da microbiota gastrointestinal que resultam em benefícios ao bem-estar e à saúde do hospedeiro (Roberfroid, 2007; Wang, 2009). Os prebióticos estimulam o crescimento preferencial de um número limitado de espécies promotoras de saúde que já residem no cólon, especialmente, mas não exclusivamente, lactobacilos e bifidobactérias (Quingley et al., 2011).

Os principais prebióticos utilizados pela indústria de alimentos mundial são os fruto-oligossacarídeos (FOS), a inulina, os isomalto-oligossacarídeos (IMO), os glico-oligossacarídeos (GOS) e os trans-galacto-oligossacarídeos (TOS). Dentre os mencionados, a inulina e os FOS são os mais estudados, sendo ainda os únicos para os quais a alegação de efeito sobre a composição da microbiota intestinal é permitida no Brasil (ANVISA, 2008).

Os probióticos sofrem a desvantagem da degradação durante o trânsito pelo trato gastrointestinal e a necessidade de controles rigorosos de qualidade durante e após a fabricação. Por outro lado, os prebióticos estimulam o desenvolvimento e aumento da viabilidade dos probióticos já existentes no cólon intestinal e aquelas que são ingeridas. Sendo assim os probióticos exercem mudanças positivas na microbiota intestinal residente (Gibson & Roberfroid, 1995).

Existem benefícios clinicamente comprovados pela ingestão de alimentos contendo ingredientes prebióticos adicionais, incluindo absorção mineral melhorada especialmente a de cálcio, o que resulta no fortalecimento da massa óssea e na prevenção/retardo da osteoporose (Bosscher & Van-Loo, 2006), redução de risco de algumas enfermidades, como diarreia associada a infecções intestinais, redução dos níveis de colesterol devido a uma influência positiva no metabolismo lipídico e moduladores do sistema imunológico (Renhe et al., 2008) e resistência à obesidade muito associada ao consumo de inulina (Delzenne & Cani, 2010).

### **3.5. Alimentos Simbióticos**

Simbióticos, com origem da palavra inglesa Synbiotic (Syn=sinergia e Biotec= para vida) podem ser definidos como a combinação de probióticos (bactérias vivas) e prebióticos

(ingredientes alimentares não digeríveis) que por sua vez são consumidos pelas bactérias em questão, gerando um sinergismo em que os prebióticos estimulam o crescimento dos probióticos no meio (Panesar et al., 2009).

A simbiose tem sido um tema central em microbiologia, devido ao aumento das demandas por parte dos consumidores, que buscam além de alimentos saudáveis, certa variabilidade dos produtos desse seguimento da indústria alimentícia (Wang, et al., 2017).

As relações simbióticas entre linhagens de lactobacilos e a bifidobactéria ocorrem, pois, por um lado, os lactobacilos possuem enzimas proteolíticas que ajudam na digestão das proteínas dos substratos, biodisponibilizando peptídeos e aminoácidos para as bifidobactérias que são pobres em peptinases. Enquanto as bifidobactérias possuem maiores complexos enzimáticos do tipo inulinasas e/ou  $\beta$  (1-2) frutosidases (Wang, et al., 2017).

Uma diversidade de estudos tem sido desenvolvida voltados a elaboração de alimentos simbióticos utilizando diferentes fontes de probióticos e prebióticos, sendo as matérias-primas lácteas boas matrizes alimentares (Araújo, et al., 2010; Cheirsilp & Radchabut, 2011; Barile et al., 2009; Pescuma et al., 2008). Além do desenvolvimento de alimentos simbióticos a base láctea, uma alternativa que vem sendo amplamente explorada pelo ramo biotecnológico, é a elaboração de bebidas simbióticas a base de extratos vegetais com potencialidade de aplicação em processos fermentativos. Esta iniciativa vem surgindo devido a limitação do consumo produtos à base láctea devido ao crescente vegetarianismo e ao grande número de indivíduos que apresentam intolerância à lactose ou em dietas restritas ao colesterol (Martins, et al., 2013).

Podem ser citados por exemplo o estudo de Wang, et al. (2017) em que foi desenvolvido um produto simbiótico à base de extrato de milho que remetesse ao iogurte tradicional, neste estudo o leite de milho foi misturado a açúcar, glicose, isolado de proteína de soja, inulina, proteína de soro de leite polimerizada e goma xantana, os autores obtiveram como resultado uma bebida com textura e consistência estáveis sem alterações no conteúdo proteico no tempo de armazenamento estudado, gerando um produto estável e com potencial de servir de alternativa ao iogurte lácteo.

Mondragón-Bernal et al. (2010) e (2017) investigaram em seus estudos a potencialidade na elaboração de um alimento simbiótico fermentado a base do extrato hidrossolúvel de soja, sua aceitabilidade sensorial e estabilidade ao armazenamento verificando haver boa aceitabilidade dessa bebida por parte do público alvo estudado e ainda, o alcance de boa estabilidade ao armazenamento. Estudos de Evangelista, et al. (2012) avaliaram a produção de uma bebida simbiótica composta por extrato hidrossolúvel de soja, frutooligossacarídeos como



prebióticos, incluindo a adição de sacarose e bactérias lácticas convencionalmente utilizadas na elaboração de iogurte, sendo obtidos resultados promissores sobre a bebida simbiótica elaborada.

Estudos recentes de Hernández-Torres (2019) investigaram os efeitos da variação da concentração de farinha de yacon e de amendoim na cinética da fermentação de 4 linhagens probióticas e sua funcionalidade, sendo verificado haver um bom desenvolvimento das bactérias probióticas em protótipos contendo 7% de farinha de yacon e 7% da farinha de amendoim, além disso também foram demonstradas características de funcionalidade positiva sobre o produto simbiótico elevada contagem de bactérias probióticas e boa resistência às condições simuladas do trato gastrointestinal humano em concordância com as normas legislativas que definem um alimento simbiótico.

Prado et al. (2008), Nicolesco & Buruleanu (2010), Nualkaekul & Charalampopoulos (2011), Pereira et al. (2011), Sheela & Suganya (2012), relataram que bebidas como sucos vegetais podem se apresentar como matrizes com composição adequada para o desenvolvimento de bactérias probióticas.

### **3.6. Fermentação Láctica e Bactérias do Ácido Láctico**

Os alimentos fermentados são geralmente definidos como aqueles alimentos ou bebidas feitos através de crescimento microbiano controlado e conversões enzimáticas de componentes alimentares. A fermentação pode ser vista como um método biológico de preservação de alimentos. Os alimentos produzidos dessa maneira têm um risco reduzido de contaminação devido a geração de compostos antimicrobianos, como ácidos orgânicos, etanol e bacteriocinas. As vantagens dos alimentos fermentados incluem também os novos e desejáveis sabores e texturas que são completamente diferentes daqueles presentes nos materiais de partida. Além dessas características, é cada vez mais compreendido que alguns alimentos fermentados também promovem a saúde (Marco et al., 2017).

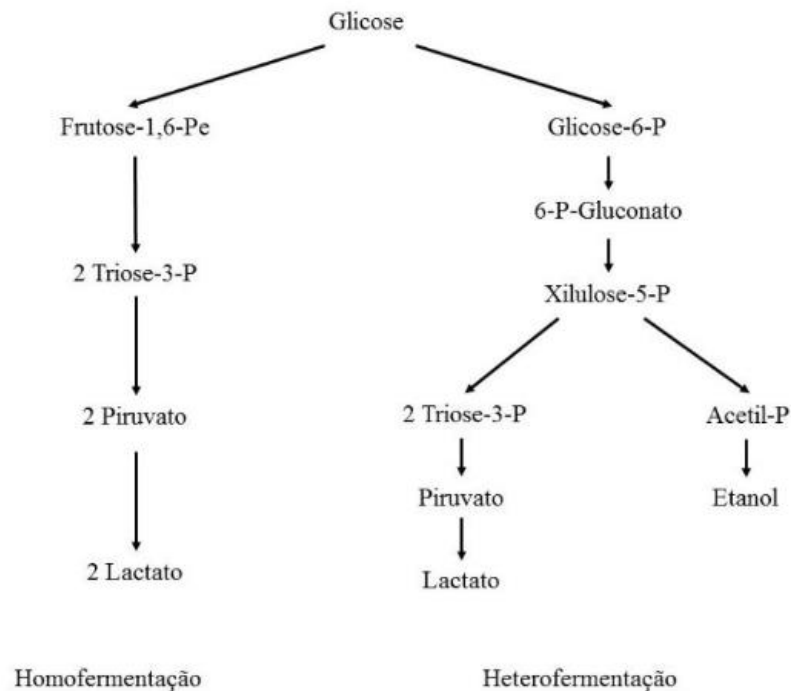
No ramo alimentício, o destaque se dá aos alimentos probióticos em que se utilizam principalmente bactérias do ácido láctico (BAL) como precursores da fermentação capazes de gerar uma série de benefícios físico-químicos ao produto e funcionais ao consumidor (Abdel-Haman et al., 2013).

As principais fontes de sacarose utilizadas pelas BAL's, deficientes em muitas rotas biossintéticas, são as hexoses e pentoses e por isso é requisitado o enriquecimento nutricional

do meio para fermentação. As bactérias lácticas são organismos estritamente fermentativos, visto que não possuem qualquer tipo de sistema respiratório, sendo a fermentação láctica a única maneira de obterem energia. Dependendo da espécie, esta fermentação pode ocorrer seguindo duas vias (Figura 3): a via homofermentativa ou a via heterofermentativa (Abdel-Rahman et al., 2013; Abreu, 2014).

As bactérias do ácido láctico (BAL's) homofermentativas possuem enzimas aldolase e produz o ácido láctico como o principal produto final. Por outro lado, as BAL's heterofermentativas produzem subprodutos além do ácido láctico (ácido acético, etanol e dióxido de carbono) através de pentoses e, portanto, o rendimento máximo de ácido láctico para a glicose atinge apenas 0,5 g/g ou 1,0 mol/mol (Abdel-Rahman et al., 2013).

Figura 3 - Vias metabólicas das bactérias do ácido láctico.



Fonte: Axelsson (2004).

As bactérias do ácido láctico (BAL) são um grupo filogeneticamente diversificado de bactérias gram-positivas diferenciadas por alguns traços tanto morfológicos como metabólicos e fisiológicos. Apresentam a forma bastonetes (*Lactobacillus* e *Carnobacterium*) e de cocos (todas os demais gêneros), a maioria é aerotolerante, catalase e oxidase negativas e sintetizam a adenosina-tri-fosfato (ATP) na fermentação láctica dos carboidratos, é deficiente em citocromos, não formam esporos e são imóveis. O grupo das BAL é provavelmente o mais

abundante encontrado na natureza, devido à sua capacidade de crescer em vários substratos e várias condições biológicas (Moreira,1993).

Pertencem aos gêneros *Aerococcus*, *Alloiococcus*, *Carnobacterium*, *Dolosigranulun*, *Enterococcus*, *Globicatella*, *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Lactosphaera*, *Leuconostoc*, *Oenococcus*, *Pediococcus*, *Streptococcus*, *Tetragenococcus*, *Vagococcus* e *Weissella*. A taxionomia inicial definiu quatro "gêneros centrais" principais envolvidos em fermentações de alimentos: *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus* e *Streptococcus*. Esses microrganismos produzem ácido acético e ácido lático compostos que se caracterizam por causar redução do pH do meio.

Com a crescente pressão dos consumidores para consumo de produtos com uso de conservantes naturais e capazes de gerar benefícios a saúde, as BAL apresentam-se como ideais, devido ao seu status GRAS (geralmente considerado como seguro) e seu status de Presunção Qualificada de Segurança (QPS) e, conseqüentemente, a exploração científica de seus produtos tem tido um interesse consistente e crescente (Crowley & Mahony, 2013).

O gênero *Lactobacillus* compreende o maior e mais diversificado grupo de bactérias do ácido lático, com características de apresentar tolerância a ácidos e conversão de açúcares em ácido lático. Sua capacidade de fermentar leite, carne e material vegetal apresenta a base para seu uso industrial (Stefanovic et al., 2017). Em geral são aerotolerantes, acidúricos ou acidofílicos, e obrigatoriamente sacaroclásticos. A temperatura para o crescimento varia de 2 a 53°C (a temperatura ideal é geralmente de 30 a 40°C) e elas podem crescer entre pH 3 e 8 (normalmente ótimo em pH 5,5–6,2) (Mattarelli et al., 2014). As espécies autorizadas pela ANVISA para sua utilização como probióticos são *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus casei shirota*, *Lactobacillus casei* variedade *rhamnosus*, *Lactobacillus casei* variedade *defensis*, *Lactobacillus paracasei*, *Lactococcus lactis* e *Enterococcus faecium* (ANVISA, 2008).

### **3.7. Bifidobactérias**

De acordo com o Taxonomic Outline of the Prokaryotes, o gênero *Bifidobacterium* pertence à família Bifidobacteriaceae. Todos os táxons são não móveis, não formam endosporos e geralmente são estritamente anaeróbicos, embora a sensibilidade ao oxigênio seja diferente entre diferentes espécies e gêneros. Além disso, a morfologia celular varia de bastões curtos, regulares e finos com extremidades pontiagudas. Eles possuem a enzima frutose-6-fosfato-fosfetoquase como uma característica chave do seu catabolismo

sacaroclástico. Os ácidos acético e láctico são formados principalmente em uma proporção molar de 3:2, enquanto que CO<sub>2</sub> não é produzido. Pequenas quantidades de etanol, ácido fórmico e ácido succínico são produzidas, não produzindo ácidos butírico ou propiônico. A temperatura ótima de crescimento varia entre 30 a 42 ° C. Nesse gênero a heterofermentação ocorre concomitantemente, e a fermentação de uma hexose resulta na formação tanto de lactato como de acetato. O crescimento geralmente ocorre na faixa de pH 5,0 a 8,0, com ótimo crescimento entre pH 6,0 e 7,0. (Mattarelli et al., 2014).

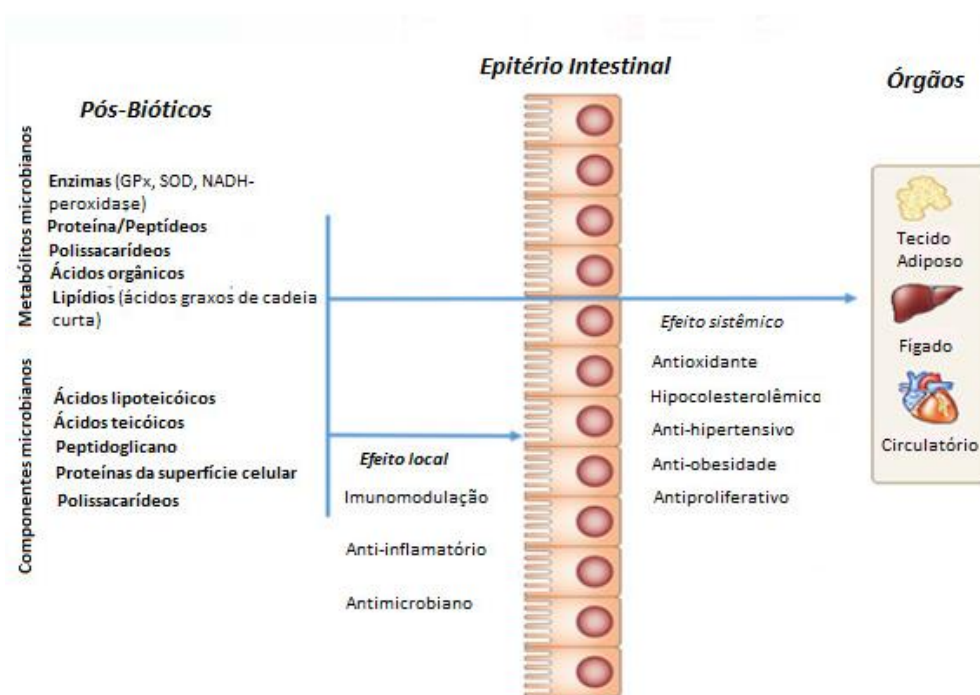
Apresentam uma via especial de fermentação de açúcar, única para o gênero, que as separam claramente do grupo de bactérias do ácido láctico. As cepas de *Bifidobacterium* são capazes de fermentar eficientemente oligo e polissacarídeos baseados em xilose. De acordo com a Resolução nº18 da ANVISA (2008) as espécies de bifidobactérias que podem ser utilizadas como probióticos são apenas *Bifidobacterium bifidum*, *B. animalis* (incluindo a subespécie *B. lactis*) e *B. longum*. Fermentam seletivamente os frutanos e preferencialmente outras fontes de carboidratos como o amido, a pectina ou a polidextrose (Fooks, Fuller & Gibson, 1999). A alta especificidade dos FOS como substratos para bifidobactérias resulta da atividade das enzimas β-frutosidases (inulinases) associadas a células específicas, as quais hidrolisam monômeros de frutose da extremidade não-redutora da cadeia de inulina ou de determinados açúcares em que o resíduo de frutose ocorre na posição β(2-1). Essas hidrolases são produzidas por alguns bolores e leveduras e só esporadicamente por bactérias (Biedrzycka, Bielecka, 2004).

### **3.8. Pos-Bióticos**

O termo pós-bióticos (*post-biòtics*) também conhecido como *metabiotics*, *biogenics* ou simplesmente metabolitos, refere-se a fatores solúveis (produtos ou subprodutos metabólicos) secretados por probióticos vivos ou liberados após sua lise. Esses subprodutos oferecem benefícios fisiológicos ao hospedeiro (Figura 4), fornecendo bioatividade adicional. Em alguns estudos, tais metabolitos foram coletados de várias cepas bacterianas, exemplos incluem ácidos graxos de cadeia curta, enzimas, peptídeos, ácidos teicóicos, muropeptídeos derivados de peptidoglicano, endo e exo-polissacarídeos, proteínas da superfície celular, vitaminas, plasmalogênios e ácidos orgânicos (Konstantinov et al., 2013; Oberg et al., 2011; Tsilingiri & Rescigno, 2013).

Pesquisas apontam que esses fatores metabólicos apresentam propriedade inibitória em relação a patogênicos e, portanto, podem ser usados como uma alternativa para o campo dos alimentos funcionais. Os pós-bióticos são não tóxicos e resistentes à hidrólise por enzimas de mamíferos. Em alguns casos também podem melhorar a função de barreira contra espécies como *Saccharomyces boulardii* (George et al., 2018).

Figura 4 - Alguns pós-bióticos e seus possíveis efeitos positivos locais e sistêmicos no hospedeiro.



Fonte: Garcia (2018).

Uma pesquisa realizada por Lee et al. (2002) relataram significativas capacidades imunorreguladoras de quatro diferentes frações de *Bifidobacterium bifidum* (ou seja, células inteiras, extratos livres de células, parede celular purificada e sobrenadante de cultura), onde cada fração mostrou diferentes padrões de reações imunes. Além disso, frações e extratos de *Bifidobacterium* e *Lactobacillus* spp., contendo altos níveis de carboidratos microbianos, mostraram profundas atividades de supressão tumoral *in vitro*. Portanto, novos termos como paraprobióticos e *post-biótics* surgiram, o que implica que a viabilidade bacteriana não é um requisito essencial para os benefícios à saúde, proporcionando uma oportunidade potencial no campo dos alimentos funcionais (Garcia, 2018).

Apesar do fato de que os mecanismos implicados nos efeitos benéficos à saúde dos pós-bióticos não estão totalmente elucidados, os dados científicos forneceram evidências de que tais

compostos possuem propriedades funcionais como antimicrobiano, antioxidante, imunomodulatório, anti-inflamatório, hipocolesterolêmicos, anti-obesogênicos, anti-hipertensivos e antiproliferativos. Estas propriedades podem afetar positivamente a homeostase da microbiota e/ou as vias metabólicas e de sinalização do hospedeiro, afetando reações fisiológicas, imunológicas, neuro-hormonais biológicas, regulatórias e metabólicas específicas (Sharma & Shukla, 2016; Shenderov, 2013).

Os exopolissacarídeos microbianos (EPS) compreendem um amplo grupo de polímeros secretados pela maioria dos microrganismos probióticos que estão ou fortemente ligados à superfície celular ou liberados como lodo extracelular no entorno da célula. Apresentam ampla aplicação nas indústrias farmacêutica, biomédica e alimentícia. Em indústrias de alimentos os EPS são amplamente utilizados como espessantes, estabilizantes, emulsionantes e agentes geleificantes, sendo muito utilizados para melhorar a reologia e textura de alimentos fermentados. Os EPS também têm capacidade de melhorar a saúde humana devido às suas atividades antioxidante, antitumoral, antiúlcera, imunomoduladora ou redutora do colesterol podendo assim ser considerado um componente pós-biótico. A viscosidade aumentada de alimentos contendo EPS contribui para um aumento no tempo de permanência do alimento fermentado ingerido no trato gastrointestinal, apoiando assim a colonização transitória por bactérias probióticas (Adebayo-Tayo et al., 2018).

Em estudos de Lukic et al. (2018), os autores fizeram o uso de uma solução contendo uma mistura de metabólitos solúveis de bactérias probióticas benéficas para o intestino humano sendo elas *Streptococcus faecalis*, *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus helveticus* e *Escherichia coli*, objetivando determinar a capacidade *in vitro* dos *post-biotics* em inibir a reprodução de 4 bactérias patogênicas para o intestino (*Proteus mirabilis*, *Staphylococcus aureus*, *Citrobacter freundii*, *Enterobacter aerogenes*). Em conclusão os autores verificaram haver eficiente inibição dos patógenos estudados pela solução pós-biótica utilizada, visto que houve redução do pH do meio favorecendo a inibição. Os dados também sugerem uma evidência para um possível modo de ação desta solução pós-biótica *in vivo*, permitindo a proliferação de bactérias benéficas para o intestino humano.

A evidência científica dos efeitos benéficos à saúde dado pelos pós-bióticos está aumentando progressivamente apesar de sua composição precisa e mecanismos subjacentes ainda estarem sob investigação. Os pós-bióticos têm vantagem devido à sua estrutura química clara, parâmetros de dose de segurança e maior prazo de validade que podem influenciar a função fisiológica do hospedeiro (Tomar et al., 2015). Na maioria dos casos, os pós-bióticos

são derivados de cepas de *Lactobacillus* e *Bifidobacterium*. Supõe-se que sejam mais estáveis do que as bactérias vivas de que são derivados (Garcia, 2018).

### 3.9. Jerivá (*Syagrus romanzoffiana*)

A palmeira de jerivá é da família Palmae, distribui-se em toda a América do Sul: no Brasil, desde o sul da Bahia, Espírito Santo, Minas Gerais e Goiás até o Rio Grande do Sul e Mato Grosso do Sul; no Paraguai; na Argentina e no Uruguai (Lorenzi, 2004). É utilizada para paisagismo e restauração de vegetação em áreas urbanas, tendo a característica de produzir grandes quantidades de frutos (Silva, et al., 2016). Mostra grande dispersão regional e é endêmica na América do Sul (Imbernon & Rocha, 2016).

O fruto amarelo e ovalado não passa de 3 cm na sua parte maior. A parte externa, carnosa, é composta de uma mucilagem adocicada muito apreciada por alguns animais como papagaios e maritacas, ou mesmo pelo ser humano. Floresce e frutifica em diferentes meses do ano, dependendo da região em que se encontra. Internamente possui uma pequena amêndoa bem parecida com a do coco-da-baía que também é consumida pelo ser humano (Coimbra, 2010).

Os estudos sobre o uso de frutos de jerivá são escassos e não há muitas informações disponíveis sobre suas características químicas, físicas e nutricionais (Silva, et al., 2016). As amêndoas do Jerivá se apresentam como substrato fermentescível interessante a ser explorado para geração de produtos com alto valor agregado por se tratar de uma PANC (Planta Alimentícia Não Convencional) e apresentar elevado teor de proteína.

Estudos de Coimbra e Jorge (2011) objetivaram realizar a caracterização centesimal da polpa e amêndoa do jerivá (Tabela 2), sendo ressaltado, em relação a amêndoa, seu considerável teor de proteínas (23,98%) e lipídeos (56,37%) demonstrando ser um potencial a ser explorado em processos fermentativos probióticos. A Figura 5 representa os cocos da palmeira de jerivá.

Figura 5 - Cocos da palmeira de Jerivá.



Fonte: Odair-Plantas, (s.d.).

Tabela 1 - Composição aproximada das amêndoas de Jerivá

<i>Compostos</i>	<i>Amêndoas do Jerivá (%)</i>
Umidade	3,94 ± 0,06
Proteínas	23,98 ± 0,51
Cinzas	1,72 ± 0,05
Lipídios	56,37 ± 0,34
Fibras Totais	10,99 ± 0,46
Carboidratos	3,01 ± 0,28
<b><i>Inulina/Oligofrutose</i></b>	<b><i>3-19%</i></b>

Fonte: Coimbra & Jorge (2011).

### 3.10. Café (*Coffea arabica*) e Aplicabilidade da Polpa

O café é a segunda maior commodity negociada no mundo depois do petróleo e a indústria do café libera enormes quantidades de subprodutos de seu processamento. Devido ao alto conteúdo de matéria orgânica, os resíduos do café são altamente poluentes, portanto encontrar forma de reaproveitar estes resíduos, além de agregar valor a eles, seria útil para diminuir seu impacto no meio ambiente (Mussato et al., 2011).

É grande a necessidade de equilibrar a produção de café com a utilização adequada de seus subprodutos. A polpa corresponde por quase 45% do grão cereja sendo um de seus principais subprodutos (Janissen & Huynh, 2018). A Figura 6 abaixo ilustra os subprodutos polpa úmida e polpa seca gerados do processamento via úmida e via seca do café, respectivamente. A Tabela 2 representa a composição química da polpa de café úmida.

Segundo levantamentos de Pleissner et al., 2016, 15 milhões de toneladas de resíduos da produção do café tem sido geradas a nível mundial sendo que 9,4 milhões de toneladas são referentes a polpa.

Figura 6 - Subprodutos gerados do processamento do café



**A- Polpa úmida**

**B- Polpa seca**

Fonte: Adaptado de Murthy & Naidu (2015).



Tabela 2 – Composição da polpa de café, expressas e matéria seca (%)

<i>Compostos (% Base Seca)</i>	<i>Polpa de café (%)</i>
Matéria Seca	22,41
Proteína Bruta	15,06
Fibra detergente neutro	62,71
Fibra detergente ácido	40,88
Lignina	18,84
Hemicelulose	11,83
Celulose	32,04
Cafeína	1,00
Cálcio	0,44
Fósforo	0,14

Fonte: Barcelos et al., 2013.

Estudos recentes relatam aplicações vistas como alternativas para o reaproveitamento da polpa do café como produção de amilase; produção de ácido cafeico, celulase, ácido clorogênico, ácido ferúlico, pectinase, polifenóis, xilanase e cogumelos (Murthy & Naidu, 2011; Nurfeta, 2010; Torres-Macera et al., 2011; Murthy & Naidu, 2012; Nogueira et al., 2011; Velazquez-Mancera et al., 2011; Sera, 2010). Visto sua composição, a polpa do café tem sido aplicada em diversos experimentos como base para a geração de bioprodutos como biogás, etanol, vinagre, proteína unicelular, enzimas e biopesticidas (Pleissner et al., 2016).

Em pesquisas realizadas por Gurram et al. (2016) os autores objetivaram investigar a possibilidade de conversão da polpa de café em etanol combustível por ação da cepa de *Saccharomyces cerevisiae*, e obtiveram produção total de etanol de 88%. Bhoite & Murthy (2014) utilizaram a polpa do café como substrato para produção da enzima tanase pelo *Penicillium verrocosum*, os autores obtiveram um índice de entorno 66,5% de degradação de taninos. No estudo de Pleissner et al. (2016), em que foram utilizados hidrolisados da polpa do café para produção de ácido láctico pela ação da cepa de *Bacillus coagulans*, os autores comprovaram ser possível boa produção de ácidos, com rendimento de 0,78 g/g, o que representou um consumo de 94,65% dos açúcares fornecidos demonstrando que a polpa do café se apresenta como potencial para a produção de ácido láctico. Menezes et al. (2013) investigaram o emprego do extrato da polpa de café para seu uso na produção de bioetanol, sendo verificado pelos autores obtiveram bom rendimento na produção de bioetanol, entorno de 70 g/L.

### 3.11. Yacon (*Smallanthus sonchifolius*)

O yacon é uma planta perene que forma raízes tuberosas geralmente apresentando entre 15 a 20 cm de comprimento e 10 cm de espessura. Normalmente é consumido cru apresentando sabor característico de uma combinação de maçã e melancia (Herbal, 2010). Se caracteriza por ser uma fonte particularmente abundante prebióticos como frutooligossacarídeos (FOS) e inulina ou oligofrutoses (40-70% em base seca), substâncias que favorecem o crescimento seletivo de probióticos e que proporcionam um efeito sinérgico positivo a saúde, servindo como ótimo ingrediente para elaboração de alimentos simbióticos (Pedreschi, et al. 2003). A frutose tem um poder adoçante 30-70% maior que o da sacarose, além de ser um adoçante não calórico e a inulina apresenta grande aplicabilidade na industrialização da enzima inulinase (Lobo, et al., 2007; Cazetta et al., 2005).

Apresentando ótima resistência à digestão no trato gastrointestinal, o yacon acaba por se apresentar como potencial para ser utilizado em sinergia com bactérias probióticas e bactérias que habitam o colón intestinal, que por sua vez, são capazes de hidrolisar esta fonte e fermentar benéficamente o meio, estimulando o sistema imunológico e prevenção ao desenvolvimento do câncer de cólon intestinal (Delgado, et al., 2010; Moura, et al., 2012).

O tubérculo apresenta potenciais propriedades promotoras de saúde, incluindo efeitos anti-diabéticos. Contém flavonoides, ácidos fenólicos e triptofano, que exibem atividades antioxidantes, anti-inflamatórias, antimicrobianas e anticâncer, sendo relatado que os compostos fenólicos presentes em sua composição protegem biomoléculas como DNA, lipídeos e proteínas, contra danos causados por radicais livres (Ojansivu et al., 2011; Simonovska et al., 2003).

Em estudos de Padilha et al. (2017), avaliou-se a aplicação do yacon na elaboração de iogurte a base láctea sendo verificados bons na estimulação do desenvolvimento de bactérias probióticas. Rodrigues, et al. (2012) verificaram o efeito da farinha de yacon sobre a bactéria láctea *Bifidobacterium longum*, na modulação de variáveis relacionadas à saúde óssea de ratos, sendo verificado elevado teor minerais nos ossos. Estudos recentes de Hernández-Torres (2019) investigaram os efeitos da variação da concentração de farinha de yacon e de amendoim na cinética da fermentação de 4 linhagens probióticas e sua funcionalidade, sendo verificado haver um bom desenvolvimento das bactérias; características de funcionalidade positiva; elevada contagem de bactérias probióticas e boa resistência às condições simuladas do trato

gastrointestinal humano. A Figura 7 representa o tubérculo yacon e a Tabela 3 a composição centesimal do Yacon *in natura*.

Figura 7 - Batata yacon.



Fonte: Conveniência Orgânica, (s.d.).

Tabela 2 - Composição centesimal do Yacon *in natura* (base úmida)

<b>Compostos</b>	<b>g/100g</b>
Umidade	86,89 ± 0,87
Fibra Bruta	3,28 ± 0,16
Proteínas Bruta	0,43 ± 0,02
Cinzas	0,35 ± 0,05
Lipídios	0,15 ± 0,05
Carboidratos Totais	14,04

Fonte: Bertolo (2017).

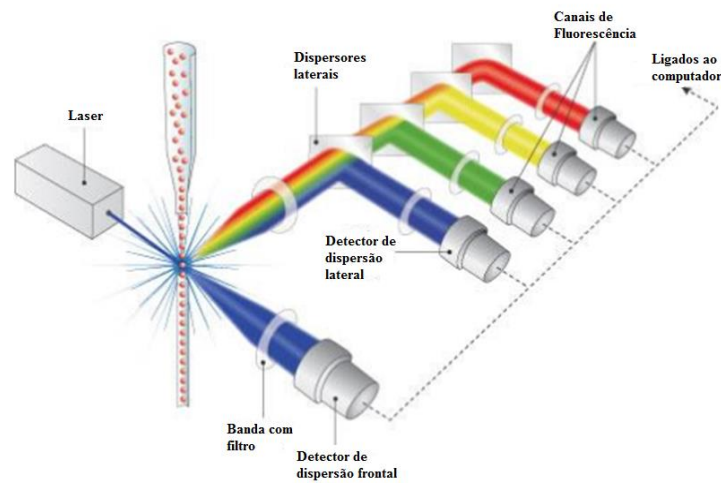
### 3.12. Citometria De Fluxo

Métodos microbiológicos rápidos têm sido desenvolvidos como alternativas aos métodos microbiológicos tradicionais para a análise quantitativa e qualitativa dos alimentos. Os métodos rápidos possuem algumas vantagens em comparação com os métodos tradicionais, como aumento da facilidade de registros, rastreabilidade dos dados, redução das etapas envolvidas e do tempo para obtenção de resultados. A citometria de fluxo se enquadra em um dos métodos rápidos de medida de viabilidade microbiológica (Brito, 2019). A principal vantagem é a velocidade de análise unicelular e, conseqüentemente, a possibilidade de fazer uma análise detalhada da população celular e sua heterogeneidade (Buyschaert & Byloos, 2016).

Um típico citômetro de fluxo contém várias partes (Figura 8): (i) Um sistema hidráulico, que produz uma corrente fluida, com uma bainha líquida ao redor da suspensão de células. Essa bainha é responsável pela passagem das partículas através de sensores, com velocidade constante. (ii) Um sistema de iluminação, que consiste de uma luz que produz sinais de reflexão e de fluorescência, quando as partículas passam por ele. (iii) Um sistema óptico, que direciona

a luz que incide sobre as partículas e recupera a luz refletida e a fluorescência, produzidas pelo fluorocromo presente nas células, e direciona ambas para o tubo fotomultiplicador apropriado. (iv) Um sistema eletrônico que transforma a luz refletida e a fluorescência captadas pelo sistema óptico em pulsos elétricos. (v) Um sistema de análise de dados, que consiste de um software que permite a análise da grande quantidade de informações produzidas pela aquisição de dados multiparamétricos (Salomão, 2012).

Figura 8 - Configurações de um citômetro de fluxo.



Fonte: Rodrigues (2017).

A técnica baseia-se na medida do espalhamento de luz quando uma célula ou partícula é interceptada, individualmente, por um feixe de luz. Tais medidas possibilitam avaliar características citométricas de uma dada população celular, permitindo sua caracterização por meio de parâmetros relacionados à sua morfologia (Pereira et al., 2011; Kuřec et al., 2009). Mais especificamente envolve a geração de uma suspensão líquida de bactérias de uma amostra de alimento que é então movida dentro de uma corrente líquida conhecida como fluido da bacia. À medida que cada célula passa por um ponto dentro do caminho do fluxo, ela é interceptada por um laser que dispersa a luz em duas direções principais conhecidas como dispersão de luz de ângulo direto ou dispersão de luz de ângulo lateral. As duas formas de dispersão, de maneira geral, podem discriminar células com base em seu tamanho e granularidade e, portanto, são usados para localizar células em um perfil conhecido como um citógrafo (Wilkinson, 2018).

O segundo, e mais específico, método de detecção e enumeração de células envolve a coleta de sinais de fluorescência emitidos em diferentes comprimentos de onda de células

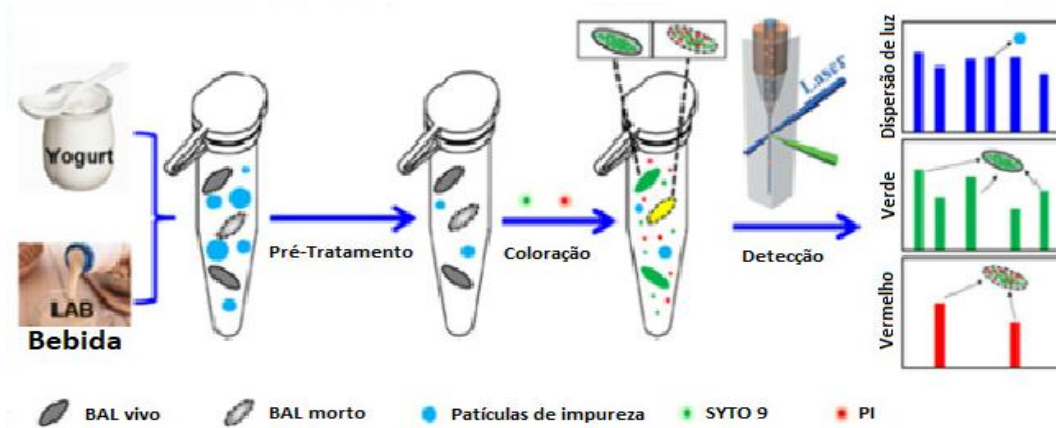
marcadas/coradas à medida que passam pelos lasers. Os dados são coletados a partir de células coradas individuais e o grau de absorção de uma coloração particular permite a discriminação de células em subpopulações discretas. Assim os dados gerados por histogramas de fluorescência refletem propriedades diferentes, como a extensão da integridade da membrana celular, funcionalidade do potencial de membrana, presença de atividade enzimática intracelular e composição da base de DNA (Wilkinson, 2018).

Os corantes relacionados com proliferação celular, apresentam a capacidade de se difundirem passivamente na célula hidrolisando o meio. Dupla coloração com CFDA (Carboxifluoresceína Diacetato Succinimidil Ester) e iodeto de propídio (PI) é comumente empregado para gerar uma distinção mais fácil entre bactérias ativas e inativas (Hoefel et al., 2003). Em particular o PI é utilizado para sondar a integridade da membrana celular enquanto a CFDA é utilizada para ensaiar a atividade da enzima intracelular (esterase). A análise de citometria de fluxo combinada com dupla coloração CFDA/PI foi aplicada com sucesso para discriminar a heterogeneidade fisiológica em algumas espécies de *Bifidobacterium* e *Lactobacillus* nos estudos de Chen et al. (2012).

A técnica de citometria de fluxo tem sido introduzida com sucesso para caracterizar probióticos, monitorando o dano celular durante o processamento e armazenamento e avaliação da viabilidade probiótica após tratamentos de estresse microbiano (Geng et al., 2014). O uso de citometria de fluxo não só permite a determinação de contagens de células viáveis, mas também permite a enumeração de subpopulações de células injuriadas e mortas. Os resultados são expressos como TFU (Total Fluorescent Units) e AFU (Active Fluorescent Units). Em dezembro de 2015, a norma internacional ISSO 19344-IDF 232 “Leite e produtos lácteos – Culturas iniciadoras, probióticos e produtos fermentados – Quantificação de bactérias do ácido láctico por citometria de fluxo” foi publicada. Este ISO específico pode ser aplicado universalmente e independentemente das espécies de interesse (Pane et al., 2018).

Estudos de Raymond e Champagne (2015) em que foi feita a validação da análise feita por citometria de fluxo através da contagem padrão de bactérias, demonstraram haver eficiência quanto ao uso do citômetro de fluxo. Em estudo de He et al. (2017) técnica foi aplicada e para a rápida quantificação de bactérias vivas/mortas em produtos lácteos probióticos utilizando a combinação dos corantes SYTO 9 e iodeto de propídio (PI) (Figura 9). Os autores verificaram que o método apresentou sucesso na detecção de bactérias do ácido láctico.

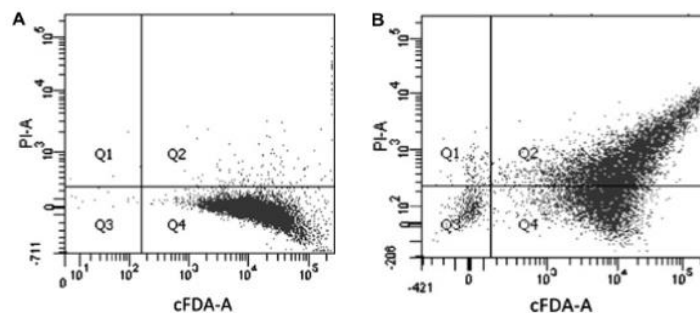
Figura 9 - Diagrama esquemático do princípio de detecção para contagem de bactéria do ácido lático viva/morta em produtos contendo probióticos utilizando a citometria de fluxo de alta sensibilidade construída em laboratório.



Fonte: He et al. (2017).

Estudos de Martin-Dejardin et al. (2013) realizaram testes de aplicação da citometria de fluxo para avaliar e comparar a viabilidade de *Bifidobacterium bifidum* com uma técnica padrão (contagem em placas), através dos gráficos multiparâmetros obtidos (Figura 10) os autores puderam distinguir as bactérias mortas, vivas, lesadas e não coradas, demonstrando que a viabilidade avaliada pelo método padrão por contagem em placas pode ser correlacionado com o obtido pela citometria de fluxo, demonstrando que esta técnica permite de fato avaliar a viabilidade de uma bactéria probiótica.

Figura 10 - Gráficos de multiparâmetros obtidos após dupla coloração PI/CFDA de células de *B. bifidum* antes (A) e após liofilização (B). Com Q1: bactérias mortas coradas; Q2: bactérias lesadas coradas; Q3: células não coradas e Q4: bactérias vivas coradas.



Fonte: Martin-Dejardin et al. (2013).

#### 4. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABDEL-RAHMAN, M.A.; TASHIRO, Y. & SONOMOTO, K. Recent advances in lactic acid production by microbial fermentation processes. **Biotechnology Advances**, v. 31, n. 6, p. 877–902, 2013.

ABREU, M.C. **O potencial bioativos de soro de queijo após fermentação láctica**. 2014. 53p. Dissertação (Mestrado em Engenharia Alimentar – Segurança Alimentar) – Universidade de Lisboa.

ADEBAYO-TAYO, B.; ISHOLA, R. & OYEWUNMI, T. Characterization , antioxidant and immunomodulatory potential on exopolysaccharide produced by wild type and mutant *Weissella confusa* strains. **Biotechnology Reports**, v. 19, 2018.

ANTUNES, A. E. C. et al. Probióticos : agentes promotores de saúde. **Brazilian Food Nutrition**, v. 32, n. 3, p. 103–122, 2007.

ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária “Regulamento técnico que estabelece as diretrizes básicas para análise e comprovação de propriedades funcionais e ou de saúde alegadas em rotulagem de alimentos”. Resolução nº 18, de 30 de abril de 1999.

\_\_\_\_\_ – Agência Nacional de Vigilância Sanitária “ Regulamento técnico de procedimetos para registro de alimento com alegação de propriedades funcionais e ou de saúde em sua rotulagem”. Resolução nº 19, de 30 de abril de 1999.

\_\_\_\_\_ – Agência Nacional de Vigilância Sanitária. “Regulamento técnico de substâncias bioativas e probióticos isolados com alegação de propriedades funcional e/ou de saúde” Resolução nº 2 de 7 de janeiro de 2002.

\_\_\_\_\_ – Agência Nacional de Vigilância Sanitária. “Alimentos com Alegações de Propriedade Funcional e ou de Saúde” Resolução nº 18. Brasil, 2008.

ARAÚJO, E.A.; CARVALHO, A.F.; LEANDRO, E.S.; FURTADO, M.M. MORAES, C.A. Development of a symbiotic cottage cheese added *Lactobacillus delbrueckii* UFV H2b20 and inulin. **Journal of Functional Foods**, vol. 2, nº1, p. 85-89, 2010.

AXELSSON, L. *Lactic Acid Bacteria: Microbiological and Functional Aspects*. Marcel Dekker, Third Edition, 2004.

AZIZ, Q., DORE, J., EMMANUEL, A., GUARNERS, F.; QUIGLEY, saúde gastrointestinal: conceitos atuais e direções futuras. **Neuro Gastroenterol Motil**, vol. 25, pág. 4-15, 2013.

BALTHAZAR, C. F.; PIMENTEL, T. C. & FERR, L. L. Sheep Milk : Physicochemical Characteristics and Relevance for Functional Food Development. **Food Science and Food Safety**, v. 16, 2017.

BARILE, D.; TAO, N.; LEBRILLA, C.B.; COISSON, J.-D.; ARLORIO, M.; GERMAN, J.B. Permeate from cheese whey ultrafiltration is a source of milk oligosaccharides. **Int. Dairy J.**, vol. 19, p. 524-530, 2009.

BERTOLO, A.P. Batata yacon: caracterização e inativação enzimática. **Revista CSBEA**, vol. 3, nº 1, 2017.

BHOITE, R. M. & MURTHY, P. S. Food and Bioproducts Processing Biodegradation of coffee pulp tannin by *Penicillium verrucosum* for production of tannase , statistical optimization and its application. **Food and Bioproducts Processing**, v. 94, p. 727–735, 2014.

BIEDRZYCKA, E.; BIELECKA, M. Prebiotic effectiveness of fructans of different degrees of polymerization. **Trends Food Sci. Technol.**, Amsterdam, v.15, p.170-175, 2004.

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

BOSSCHER, D. & VAN-LOO, J. F. Inulina e oligofrutose: como ingredientes funcionais para melhorar a mineralização óssea. **Int Dairy J**, vol.16, 2006.

BRITO, N.M.R. **Identificação rápida de contaminantes microbianos em produtos farmacêuticos**. 2019. 109p. Dissertação (Mestrado em Farmácia e Medicamentos) – Universidade de São Paulo.

BUYSSCHAERT, B. & BYLOOS, B. Reevaluating multicolor flow cytometry to assess microbial viability. **Applied Microbiology and Biotechnology**, p. 9037–9051, 2016

CAZETTA, M.L.; MARTINS, P.M.M.; MONTI, R.; CONTIERO, J. Yacon (*Polymnia sonchifolia*) extract as a substrate to produce inulinase by *Kluyveromyces marxianus* var. *bulgaricus*. **J Food Eng**, v. 66, p. 301–305, 2005.

CHEIRSILP, B.; RADCHABUT, S. Use of whey lactose from dairy industry for economical kefiran production by *Lactobacillus kefiranofaciens* in mixed cultures with yeasts. **New Biotech.**, vol. 28, pp. 574-580, 2011.

CHEN, S.; CAO, Y. & FERGUSON, L. R. Flow cytometric assessment of the protectants for enhanced in vitro survival of probiotic lactic acid bacteria through simulated human gastrointestinal stresses. **Applied Microbiology Biotechnology**, p. 345–356, 2012.

COIMBRA, M.C. **Caracterização dos frutos e dos óleos extraídos da polpa e amêndoa de guariroba (*Syagrus oleracea*), jervá (*Syagrus romanzoffiana*) e macaúba (*Acrocomia aculeata*)**. Dissertação (Mestrado em Ciência de Alimentos) – Universidade Estadual Paulista, 2010.

COIMBRA, M.C. & JORGE, N. Proximate composition of guariroba (*Syagrus oleracea*), jervá (*Syagrus romanzoffiana*) and macaúba (*Acrocomia aculeata*) palm fruits. **Food Research International**, v. 44, p. 2139-2142, 2011.

CROWLEY, S. & MAHONY, J. Current perspectives on antifungal lactic acid bacteria as natural. **Trends in Food Science & Technology**, v. 33, n. 2, p. 93–109, 2013.



DALIRI, E. & LEE, B. H. New perspectives on probiotics in health and disease. **Food Science and Human Wellness**, v. 4, n. 2, p. 56–65, 2015.

DELGADO, C.G.T.; TAMASHIRO W.M.S.C.; PASTORE, G. Immunomodulatory effects of fructans. **Food Res Int**, vol. 43, p.1231–1236, 2010.

DELGADO, G.T.C.; TAMASHIRO, W.M.S.C.; MARÓSTICA-JÚNIOR, M.R.; PASTORE, G.M. Yacon (*Smallanthus sonchifolius*): A Functional Food, **Plant Foods for Human Nutrition**, vol. 68, nº3, pág. 222-228, 2013.

DELGADO, S.; GUEIMONDE, M. & MARGOLLES, A. Probiotics , gut microbiota , and their influence on host. **Molecular Nutrition & Food Research**, v. 2, p. 1–15, 2017.

DELZENNE, M.N. & CANI, P.D. Modulação nutricional da microbiota intestinal sem contexto da obesidade e resistência à insulina: potencial interesse de profissionais. **Int J Dairy**, vol. 20, 2010.

EJTAHED, H.S. et al. Effect of probiotic yogurt containing *Lactobacillus acidophilus* and *Bifidobacterium lactis* on lipid profile in individuals with type 2 diabetes mellitus. **Journal of Dairy Science**, v.94, n.7, p.3288-3294, 2011

ESPIRITO-SANTO, A.P.; MOUQUET-RIVIER, C.; HUMBLLOT, C.; CAZEVIEILLE, C.; ICARD-VENIÈRE, C.; SOCOOL, C.R.; GUYOT, J.P.; Influence of cofermentation by amyolytic *Lactobacillus* strains and probiotic bacteria on the fermentation process, viscosity and microstructure of gruels made of rice, soy milk and passion fruit fiber. **Food Research International**, v. 57, p. 104-113, 2014.

EVANGELISTA, S.R.; GISLAINE, G.; MAUGERI, F. Development of a Soy-Based Synbiotic Beverage. **Food and Nutrition Sciences**, vol. 3, nº 8, 8 pag., 2012.

FINLEY, J.W. Functional foods. Adequate Food for All: **Culture, Science, and Technology of Food in the 21st Century**, v. 64, n. 7, p. 201–216, 2009.

GARCIA, H S. Postbiotics : An evolving term within the functional foods field. **Trends in Food Science & Technology**, v. 75, n. March, p. 105–114, 2018.

GENG, J.; CHIRON, C. & COMBRISSE, J. Rapid and specific enumeration of viable *Bifidobacteria* in dairy products based on flow cytometry technology : A proof of concept study. **International Dairy Journal**, v. 37, n. 1, p. 1–4, 2014.

GEORGE, K.; R. et al. Benefaction of probiotics for human health: A review. **Journal of Food and Drug Analysis**, v. 26, n. 3, p. 927–939, 2018.

GIBSON, G.R. & ROBERFROID, M.B. Modulação dietética da microflora colônica humana, introduzindo o conceito de prebióticos . **J. Nutr.** Vol. 125, 1995.

GURRAM, R.; SAMUEL, M. A. & TAPAS, K. Technical possibilities of bioethanol production from coffee pulp : a renewable feedstock. **Clean Technologies and Environmental Policy**, v. 18, n. 1, p. 269–278, 2016.

HAGE, R E.L.; HERNANDEZ-SANABRIA, E. & WIELE, T.V. D. Emerging Trends in “ Smart Probiotics ”: Functional Consideration for the Development of Novel Health and Industrial Applications. **Frontiers in Microbiology**, v. 8, p. 1–11, 2017.

HERNÁNDEZ-TORRES, D.L.H. **Cinética, formulação e funcionalidade de fermentados de farinha de yacon (*S. sonchifolius*) e amendoim (*Arachis hypogae L.*) por quatro linhagens probióticas. 80 p. 2019.** Dissertação (Mestrado em Ciências dos Alimentos) – Universidade Federal de Lavras.

HE, S.; HONG, X.; HUANG, T.; ZHANG, W.; ZHOU, Y.; WU, L.; YAN, X. Rapid quantification of live/dead lactic acid bacteria in probiotic products using high-sensitivity flow cytometry. **Methods and Application in Fluorescence**, 2017.

HERBAL GUIDES ANONYMOUS (2010).

IMBERNON, R.A.L. & ROCHA, R.G. Biogeochemical coefficients as indicators of nutrient element sorption in jerivá (*Syagrus romanzoffiana*), a palm tree species from Brazil. **Environmental Earth Sciences**, vol. 75, pág.515, 2016.

JANISSEN, B. & HUYNH, T. Chemical composition and value-adding applications of coffee industry by-products: A review. **Resources, Conservation & Recycling** v. 128, n. October 2017, p. 110–117, 2018.

KONSTANTINOV, S.R.; KUIPERS, E.J., PEPPELENBOSCH, M.P. Functional genomic analyses of the gut microbiota for CRC screening. **Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology**, v. 10, p. 741-745, 2013.

KUREC M., BASZCZYNSKI M., LEHNERT R., MOTA, A., TEIXEIRA, J.A., BRÁNYIK T. Flow Cytometry for Age Assessment of a Yeast Population and its Application in Beer Fermentations. **Journal of the institute of brewing**, vol. 115, n°. 3, pag. 252-258, 2009.

LACROIX, C. & YILDIRIM, S. Fermentation technologies for the production of probiotics with high viability and functionality. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 18, p. 176–183, 2007.

LEE, E.; ZANG, Z.; CHOI, E.Y.; SHIN, H.K. JI, G.E. Cytoskeleton reorganization and cytokine production of macrophages by Bifidobacterial cells and cell-free extracts. **Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 3, p. 398-405, 2002.

LOLLO, P.C.B. et al. Probiotic yogurt offers higher immune-protection than probiotic whey beverage. **Food Research International**, v.54, n.1, p.118-124, 2013.

LORENZI, H. Palmeiras brasileiras e exóticas cultivadas. **Instituto Plantarum, Nova Odessa**, 160 p. 2004.

LOBO, A.R.; COLLI, C.; ALVARES, E.P.; FILISETTI, T.M. Effects of fructans-containing yacon (*Smallanthus sonchifolius* Poepp & Endl.) flour on cecum mucosal morphometry, calcium and magnesium balance, and bone calcium retention in growing rats. **Br J Nutr**, v. 97, p. 776–78, 2007.

LUKIC, J.; CHEN, V.; STRAHINIC, I.; BEGOVIC, J.; LEV-TOV, H.; DAVIS, S.C.; TOMIC-CANIC, M.; PASTAR, I. Probiotic or Pro-healers the roles of beneficial bacteria in tissue repair. **Wound Repair Regen**, vol. 25, n°6, p. 912-922, 2018.

MARTIN-DEJARDIN, F. et al. A way to follow the viability of encapsulated *Bifidobacterium bifidum* subjected to a freeze-drying process in order to target the colon : Interest of flow cytometry. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 49, n. 2, p. 166–174, 2013.

MARTINS, E.M.; RAMOS, A.M.; VANZELA, E.S.; STRINGHETA, P.C.; OLIVEIRA, A.L. MATINS, J.M. Products of vegetable origin: A new alternative for the consumption of probiotic bacteria. **Food Research International**, v. 51, n°2, pág. 764-770, 2013.

MATOS, J. & CARDOSO, C. Function Microalgae as healthy ingredients for functional food : a review. **Food & Function**, v.8, p. 2672–2685, 2017.

MARCO, M. L. et al. Health benefits of fermented foods : microbiota and beyond Michael Ga. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 44, p. 94–102, 2017.

MATTARELLI, P. et al. Taxonomic Note Recommended minimal standards for description of new taxa of the genera *Bifidobacterium* , *Lactobacillus* and related genera. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 64, p. 1434–1451, 2014.

MENEZES, E.G.T.; CARMO, J.R.; MENEZES, A.G.T.; ALVES, J.G.L.F.; PIMENTA, C.J.; QUEIROZ, F. Use of different extractes of coffe pulp for the production of bioethanol. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v.169, n°2, p. 673-687, 2013.

MONDRAGÓN-BERNAL, O.L. **Desenvolvimento de uma bebida fermentada a partir do extrato hidrossolúvel de soja, contendo agentes probióticos e prebióticos**. 2004. 103 p. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Alimentos) – Universidade Estadual de Campinas.

MONDRAGÓN-BERNAL, O.L. **Desenvolvimento de alimento simbiótico fermentado de soja**. 2009. 218 p. Tese (Doutorado em Engenharia de Alimentos) – Universidade Estadual de Campinas.

MONDRAGÓN-BERNAL, O.L.; RODRIGUES, M.I.; BOLINI, H.M.A.; MAUGERI, F. Optimization of synbiotic fermented food from hydrosoluble soy extract applying experimental design and sensory analysis techniques. **Journal of Sensory Studies**, v.25, n°3, 2010.

MONDRAGÓN-BERNAL, O.L.; TEIXEIRA, M.A.; ALVES, J.G.L.F.; RODRIGUES, M.I.; MAUGERI, F.F. Stability and functionality of synbiotic soy food during shelf-life. **Journal of Functional Foods**, v.35, p.134-145, 2017.

MOREIRA, W.L.; HERNÁNDEZ, P.E.; RODRIGUES, J.M. CINTAS, L.M.; SOBRINO, O.J.; FERNÁNDEZ, M.F.; SANZ, B. Utiización de bacterias lácticas em el control de microorganismos patógenos de los alimentos. **Microbiologia Sem.**, vol. 9, p. 37-48, 1993.

MOURA, N.A.; CAETANO, B.F.; SIVIERI, K.; URBANO, L.H.; CABELLO, C.; RODRIGUES, M.A.; BARBISAN, L.F. Protective effects of yacon (*Smallanthus sonchifolius*) intake on experimental colon carcinogenesis. **Food Chem Toxicol**, v.50, p. 902–2910, 2012.

MUSSATO, S.I.; MACHADO, E.M.S.; MARTINS, S.; TEIXEIRA, J.A. Production, Composition, and Application of Coffe and Its Industrial Residues. **Food and Bioprocess Technology**, v. 4, p. 661, 2011.

MURTHY, P.S. & NAIDU, M.M. Improvement of robusta coffee fermentation with microbial enzymes. **Eur. J. Appl. Sci.** Vol.3, p. 130–139, 2011.

MURTHY, P.S. & NAIDU, M.M. Production and application of xylanase from penicillium sp. utilizing coffee by-products. **Food Bioprocess Technol.** Vol. 5, nº 2, p. 657–664, 2012

NABAVI, S. et al. Effects of probiotic yogurt consumption on metabolic factors in individuals with nonalcoholic fatty liver disease. **Journal Dairy Science**, v.97, p.7386-7393, 2014.

NAGPAL, R. et al. Probiotics, their health benefits and applications for developing healthier foods: A review. **FEMS Microbiology Letters**, v. 334, n. 1, p. 1–15, 2012.

NICOLESCO, C.L. & BURULEANU, L.C. Correlation of some substrate parameters in growing *Lactobacillus acidophilus* on vegetable and fruit cocktail juices Bulletin **UASVM Agriculture**, vol. 67, pp. 352-359, 2010.

NURFETA, A. Feed intake, digestibility, nitrogen utilization, and body weight change of sheep consuming wheat straw supplemented with local agricultural and agro-industrial by-products. **Trop. Anim. Health Prod.** Vol. 42, nº 5, p. 815–824, 2010.

NUALKAEKUL, S. & CHARALAMPOPOULOS, D. Survival of *Lactobacillus plantarum* in model solutions and fruit juices. **International Journal of Food Microbiology**, vol. 146, p. 111-117, 2011.

OBERG, T.S.; STEELE, J.L.; INGHAM, S.C.; SMEIANOV, V.V.; BRINCZINSKI, E.P.; ABDALLA, A. Intrinsic and inducible resistance to hydrogen peroxide in *Bifidobacterium* species. **Journal of industrial. Microbiology and Biotechnology.** v. 38, p. 1947-1953, 2011.

OJANSIVU, I.; FERREIRA, C.L.; SALMINEN, S. Yacon, a new source of prebiotic oligosaccharides with a history of safe use. **Trends in Food Science & Technology**, v.22, p. 40-46, 2011.

PANE, M.B.S. et al. Flow Cytometry: Evolution of Microbiological Methods for Probiotics Enumeration. **Journal of Clinical Gastroenterology**, vol. 52, p. 41-45, 2018.

PANESAR, P.S.; KAUR, G.; PANESAR, R.; BERA, M.B. Simbióticos: potenciais suplementos alimentares em alimentos funcionais. **Central de Ciência de Alimentos**, 2009.  
PADILHA, V.M.; ANDRADE, S.A.C.; VALENCIA, M.S.; STAMFORD, T.L.M.; SALGADO, S.M. Optimization of synbiotic yogurts with yacon pulo (*Smallanthus sonchifolius*) and assessment of the viability of lactic acid bacteria. **Food Science and Technology**, v. 37, nº2, 2017.

PESCUMA, M.; HÉBERT, E.M; MOZZI, F.; FONT DE VALDEZ, G. Whey fermentation by thermophilic lactic acid bacteria: evolution of carbohydrates and protein content. **Food Microbiol.**, vol. 25, p. 442-451,2008.

PEREIRA, A.L.F.; MACIEL, T.C.; RODRIGUES, S. Probiotic beverage from cashew apple juice fermented with *Lactobacillus casei*. **Food Research International**, vol. 44, p. 1276-1283, 2011.

PEREIRA et al. Analysis of *Aspergillus nidulans* germination, initial growth and carbon source response by flow cytometry. **Journal of Basic Microbiology**, vol. 51, p.1-8, 2011.

PEDRESCHI, R.; CAMPOS, D.; NORATTO, G.; CHIRINOS, R.; CISNEROS-ZEVALLOS, L. Andean yacon root (*Smallanthus sonchifolius* Poepp. Endl) fructooligosaccharides as a potential novel source of prebiotics. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.51, p. 5278-5284, 2003.

PLEISSNER, D. et al. Bioresource Technology Fermentative lactic acid production from coffee pulp hydrolysate using *Bacillus coagulans* at laboratory and pilot scales. **Bioresource Technology**, v. 218, p. 167–173, 2016.

PRESTI, I.; D’ORAZIO, G.; LABRA, M.; FERLA, B.; MEZZASALMA, V.; BIZZARO, G.; GIARDINA, S.; MICHELOTTI, A.; TURSI, F.; VASSALO, M.; DI GENARO, P.; Evaluation of the probiotic properties of the new *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* strains and their in vitro effect. **Applied Microbiology and Biotechnology**, 2015, v. 99, p. 5623-5626.

PRADO, F.C.; PARADA, J.L.; PANDEY, A.; SOCCOL, C.R. Trends in non-dairy probiotic beverages. **Food Research International**, vol. 41,p. 111-123, 2008.

PUUPPONEN-PIMIÄ, R. et al. Development of functional ingredients for gut health. **Trends in Food Science and Technology**, v.13, n.1, p.3-11, 2002.

WANE, D. Clinical Uses of Probiotics. **Journal Medicine (Baltimore)**, vol. 95, nº5, 2016.

QUINGLEY, E.M.M. et al. Prebiotics and Probiotics. **Nutrition in Clinical Practice**, v.27, 2011.

RAYMOND, Y. & CHAMPAGNE, C. P. The use of flow cytometry to accurately ascertain total and viable counts of *Lactobacillus rhamnosus* in chocolate. **Food Microbiology**, v. 46, p. 176–183, 2015.

RENHE, I.R.T.; VOLP, A.C.P.; BARBOSA, K.B.F.; STRINGHETA, K.B.F. Prebióticos e os benefícios de seu consumo na saúde. **Rev. Bras. Nut. Clin.**, vol. 23, 2008.

ROBERFROID, M.B. “Inulin-type fructans: functional food ingredients”. **Journal of Nutrition**, v. 137, n.11, p. 2493-2502, 2007.

RODRIGUES, C.C. **Análise do comportamento proliferativo de uma linhagem de *Saccharomyces cerevisiae* por citometria de fluxo**. 2017. 72p. Dissertação (Mestre em Ciências Farmacêuticas) – Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri.

RODRIGUES, F.C.; CASTRO, A.S.B.; RODRIGUES, V.C.; FERNANDES, S.A.; FONTES, E.A.F.; OLIVEIRA, T.T.; MARTINO, H.S.D.; FERREIRA, C.L.L. Yacon Flour and Bifidobacterium longum Modulate Bone Health in Rats. **Journal of Medicinal Food**, vol. 15, nº7, 2012.

SALOMÃO, V.S.C. **Influência de diferentes tipos de microrganismos na contagem bacteriana total e de células somáticas por citometria de fluxo e na composição centesimal do leite cru**. 2012. 48p. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) – Universidade Federal de Minas Gerais.

SANDERS, M. E. & MARCO, M. L. Food Formats for Effective Delivery of Probiotics. **Food Science and Technology**, v. 1, n. 1, p. 65–85, 2010.

SERA, T. *Coffee Biotechnology and Quality*. Dordrecht: Springer, Netherlands, Dordrecht, 2011.

SHEELA, T. & SUGANYA, R.S. Studies on anti-diarrhoeal activity of synbiotic plums juice. **International Journal of Scientific and Research Publications**, vol. 2, p. 1-5, 2012.

SHARMA M.; SHUKLA, G. Metabiotics: One step ahead of probiotics; an insight into mechanisms involved in anticancerous effect in colorectal câncer. **Frontiers in Microbiology**, v.7, p.1940, 2016.

SHENDEROV, B.A. Metabiotics: Novel idea or natural development of probiotic conception. **Microbial Ecology in Health and Disease**, v. p. 1-8, 2013

SILVA, E.P.; SIQUEIRA, H.H.; DAMIANI, C.; VILAS-BOAS, E.V.B. Physicochemical and sensory characteristics of snack bars added of jervivá flour (*Syagrus romanzoffiana*). **Food Science and Technology**, v. 36, nº3, 2016.

SIMONOVSKA, B.; VOVK, I.; ANDRENSEK, S.; VALENTOVÁ, K.; ULRICHOVÁ, J. Investigation of phenolic acids in yacon (*Smallanthus sonchifolius*) leaves and tubers. **J Chromatogr**, p. 89–98, 2003.

STEFANOVIC, E.; FITZGERALD, G. & MCAULIFFE, O. Advances in the genomics and metabolomics of dairy lactobacilli : A review. **Food Microbiology**, v. 61, p. 33–49, 2017.

STALIANO, P. **Promoção e comunicação em saúde: um estudo sobre a atuação de agentes comunitários**. 2012. 215 p. Tese (Doutorado em Processos de Desenvolvimento Humano e Saúde) – Universidade de Brasília.

TAMANG, J. P. et al. Functional Properties of Microorganisms in Fermented Foods. **Frontiers in Microbiology**, v. 7, n. April, p. 1–13, 2016.

TORRES-TABORDA, M. & AGROINDUSTRIALES, M. Bacteriocinas producidas por bacterias ácido. **Grupo De Investigaciones**, v. 23, n. 36, p. 186–205, 2015.

TOMAR, S. K. et al. Role of probiotics , prebiotics , synbiotics and postbiotics in inhibition of pathogens. **The Battle Against Pathogens**, p. 717–732, 2015.

TORRES-MANCERA, M.; CORDOVA-LÓPEZ, J.; RODRÍGUEZ-SERRANO, G.; ROUSSOS, S.; RAMÍREZ-CORONEL, M.; FAVELA-TORRES, E.; SAUCEDO-ASTAÑEDA, G. Enzymatic extraction of hydroxycinnamic acids from coffee pulp. **Food Technol. Biotechnol.** Vol. 49, n° 3, p. 369–373, 2011.

TSILINGIRI, K.; RESCIGNO, M. Postbiotics: What else? **Beneficial Microbes**, v.4, p. 101-107, 2013.

VALENCIA, N.R. Producción de alcohol a partir de la pulpa de café. **Cenicafé**, v. 64, n. 2, p. 78–93, 2013.

VELAZQUEZ-CEDENO, M.A.; MATA, G.; SAVOIE, J.M. Waste-reducing cultivation of *Pleurotus ostreatus* and *Pleurotus pulmonarius* on coffee pulp: changes in the production of some lignocellulolytic enzymes. **World J. Microbiol. Biotechnol.** vol. 18 n° 3, p. 201–207, 2011.

WANG, Y. “Prebiotics: present and future in food Science and technology”. **Food Research International**, v.42, p.8-12, 2009.

WANG, C.; ZHENG, H.; LIU, T.; WANG, D.; GUO, M. Pgyiochemical Properties and Probiotic Survivability of Symbiotic Corn-Based Yogurt-Like Product. **Journal of Food Science**, v. 82, n°9, 2017.

WILKINSON, M. G. Flow cytometry as a potential method of measuring bacterial viability in probiotic products : A review. **Trends in Food Science & Technology**, v. 78, p. 1–10, 2018.

## **CAPÍTULO 2**



## FORMULAÇÃO E TESTES DE FUNCIONALIDADE DE BEBIDA SIMBIÓTICA A BASE DE POLPA DE CAFÉ, AMÊNDOAS DE JERIVÁ E FARINHA DE YACON.

Fernanda Maria de Sousa\*<sup>1</sup>; Matheus Felipe de Souza Oliveira<sup>2</sup>; Katherine Leslie Ayres Moura<sup>3</sup>; Flávio Meira Borém<sup>4</sup>; Elaine Maria Seles Dorneles<sup>5</sup>; Felipe Almendagna Rodrigues<sup>6</sup>; José Guilherme Lembi Ferreira Alves<sup>7</sup>; Olga Lucía Mondragón Bernal<sup>8</sup>

<sup>1,3</sup> Mestranda em Engenharia de Alimentos, Departamento de Ciências dos Alimentos, Universidade Federal de Lavras.

<sup>2</sup> Mestrando em Ciências dos Alimentos, Departamento de Ciências dos Alimentos, Universidade Federal de Lavras.

<sup>4</sup> Professor Doutor em Produção Vegetal, Departamento de Engenharia, Universidade Federal de Lavras.

<sup>5</sup> Professora Doutora em Ciência Animal, Departamento de Medicina Veterinária, Universidade Federal de Lavras.

<sup>6</sup> Técnico Doutor em Agronomia e Fitotecnia, Departamento de Agricultura, Universidade Federal de Lavras.

<sup>7</sup> Professor Doutor em Engenharia de Alimentos, Departamento de Ciências dos Alimentos, Universidade Federal de Lavras.

<sup>8</sup> Professora Doutora em Engenharia de Alimentos, Departamento de Ciências dos Alimentos, Universidade Federal de Lavras.

\*E-mail para correspondência: olga@ufla.br; fersoousa@outlook.com.

### RESUMO

Devido à crescente demanda por alimentos benéficos a saúde e ainda com baixo impacto ambiental, a indústria do ramo fermentativo vem apostando em estudos que envolvam fontes vegetais alternativas como resíduos de processamento agrícola, como a polpa do café, e PANC's (Plantas Alimentícias Não Convencionais), como as amêndoas do jerivá. O objetivo deste projeto foi otimizar o processo de fermentação de meio à base de extratos da polpa de café arábica (EPC), amêndoas do jerivá (EAJ) e farinha de yacon (FrY) com probióticos, através de uma estratégia sequencial de planejamentos aplicando inicialmente o Plackett e Burman e em seguida o DCCR (Delineamento Composto Central Rotacional). Foram fermentados 50 mL de diferentes formulações em triplicata com *Lactobacillus rhamnosus* e *Bifidobacterium longum* a 37°C em anaerobiose, conduzidas até pH≈4,5 para obtenção de uma bebida sensorialmente equilibrada. Após análise por Plackett e Burman, concluiu-se que, as variáveis independentes mais importantes foram EPC e FrY, por diminuírem o tempo de fermentação da bebida simbiótica (t≈20h), com bom crescimento celular (≈5 LogUFC.mL<sup>-1</sup>), consumo de açúcares totais (C<sub>AT</sub>) e redutores (C<sub>AR</sub>) (máx=68,0 g/L e 43,2 g/L, respectivamente), produção

de exopolissacarídeos (máx=0,9 g/L) e ácidos orgânicos (máx= 1,08g/L). Os resultados do DCCR indicaram que as variáveis respostas Tempo; CrescTotal; CrescLR; CrescBL;  $C_{AT}$ ;  $P_{AT}$  e Parâmetros de cor  $L^*$ ,  $a^*$ ,  $b^*$  apresentaram bom ajuste do modelo a 95% de confiança ( $p<0,05$ ). Os melhores protótipos de bebida simbiótica continham de 10 a 14 % m/v de Farinha de Yacon, 8 a 16 % v/v de extrato de polpa de café, 5% v/v de extrato de polpa de café funcional e 17,5% v/v de extrato de amêndoas de jervá, com as melhores contagens de células ( $\approx 13$  LogUFC.mL<sup>-1</sup>). Através da validação dos modelos nessas condições, foi possível prever o tempo de fermentação (em torno de 20h) e os CresTotal (em torno de 5,1 Log UFC.mL<sup>-1</sup>); CrescLR (em torno de 5,3 LogUFC.mL<sup>-1</sup>) e CrescBL (em torno de 5,02 LogUFC.mL<sup>-1</sup>). Dos tratamentos do DCCR, o que apresentou maior produção de ácido láctico (5,3 g/L) (HPLC) e maior concentração de células vivas (48,45%) (Citometria de Fluxo) ao final da fermentação foi o Tratamento 4, (22,1% m/v de FrY e 25,6% v/v de EPC), sendo identificados compostos pós-bióticos em todos os tratamentos avaliados com máximo de 26,15% no Tratamento 5 (5 % m/v de FrY e 15 % v/v de EPC), o que garante funcionalidades a bebida. Dos testes funcionais *in vitro* notou-se maiores contagens de probióticos nas primeiras 3 horas de digestão (8,1 LogUFC.mL<sup>-1</sup>) com queda drástica após 4 horas de digestão (5,5 LogUFC.mL<sup>-1</sup>) e a capacidade de aderência das células ao tecido linfóide associado ao intestino variaram de baixa (%H=32,07 Tratamento 1 da Validação) a média (%H=39,31 do Tratamento 2 da Validação).

**Palavras-chave:** Probióticos; Extratos Vegetais; *Coffea arábica*; *Lactobacillus rhamnosus*; *Bifidobacterium longum*

## ABSTRACT

Due to the growing demand for foods that are beneficial to health and with low environmental impact, the fermentation industry has been betting on studies involving alternative plant sources such as agricultural processing residues, such as coffee pulp, and PANC's (Unconventional Food Plants), like jervá almonds. The objective of this project was to optimize the fermentation process of a medium based on extracts of arabica coffee pulp (EPC), jervá almonds (EAJ) and yacon flour (FrY) with probiotics, through a sequential planning strategy applying initially the Plackett and Burman and then the DCCR (Central Composite Rotational Design). 50 mL of different formulations were fermented in triplicate with *Lactobacillus rhamnosus* and *Bifidobacterium longum* at 37°C in anaerobic conditions,

brought to pH $\approx$ 4.5 to obtain a sensorially balanced drink. After analysis by Plackett and Burman, it was concluded that the most important independent variables were EPC and FrY, as they reduced the fermentation time of the symbiotic drink ( $t\approx$ 20h), with good cell growth ( $\approx$ 5 LogUFC.mL<sup>-1</sup>), consumption of total (CAT) and reducing (CAR) sugars (max=68.0 g/L and 43.2 g/L, respectively), production of exopolysaccharides (max=0.9 g/L) and organic acids (max=1.08g/L). The DCCR results indicated that the response variables Time; TotalGrow; GrowLR; GrowBL; CAT; PAT and Color parameters L\*, a\*, b\* showed a good fit of the model at 95% confidence ( $p<$ 0.05). The best prototypes of symbiotic drink contained 10 to 14 % w/v of Yacon Flour, 8 to 16 % v/v of coffee pulp extract, 5% v/v of functional coffee pulp extract and 17.5 % v/v of jervivá almond extract, with the best cell counts ( $\approx$ 13 LogUFC.mL<sup>-1</sup>). By validating the models under these conditions, it was possible to predict the fermentation time (around 20h) and CresTotal (around 5.1 Log CFU.mL<sup>-1</sup>); CrescLR (around 5.3 LogUFC.mL<sup>-1</sup>) and CrescBL (around 5.02 LogUFC.mL<sup>-1</sup>). Of the DCCR treatments, the one that showed the highest production of lactic acid (5.3 g/L) (HPLC) and the highest concentration of live cells (48.45%) (Flow Cytometry) at the end of fermentation was Treatment 4, (22.1% m/v of FrY and 25.6% v/v of EPC), with postbiotic compounds being identified in all treatments evaluated with a maximum of 26.15% in Treatment 5 (5% m/v of FrY and 15 % v/v EPC), which guarantees beverage functionality. In vitro functional tests showed higher probiotic counts in the first 3 hours of digestion (8.1 LogUFC.mL<sup>-1</sup>) with a drastic drop after 4 hours of digestion (5.5 LogUFC.mL<sup>-1</sup>) and the ability to Cell adherence to gut-associated lymphoid tissue ranged from low (%H=32.07 Treatment 1 of Validation) to medium (%H=39.31 of Treatment 2 of Validation).

**Keywords:** Probiotics; Vegetable Extracts; Arabica coffee; *Lactobacillus rhamnosus*; *Bifidobacterium longum*.

## 1. INTRODUÇÃO

Devido à crescente demanda atual dos consumidores por alimentos capazes de gerar benefícios a sua saúde, as indústrias dos mais diversos setores do ramo têm voltado sua atenção ao desenvolvimento de produtos saudáveis, como os alimentos funcionais. Alimentos funcionais, além de promover efeitos nutricionais básicos, também geram benefícios à saúde

humana, como é o caso dos alimentos simbióticos (Finley, 2009; Balthazar et al., 2017). Simbióticos ou Synbiotics (Syn=sinergismo; Biotec=para vida), contém microrganismos probióticos, microrganismos vivos capazes de gerar benefícios a a saúde, e ingredientes prebióticos, sendo os prebióticos responsáveis por estimular o desenvolvimento e aumento da viabilidade dos microrganismos, promovendo efeito sinérgico entre probióticos e prebióticos (Panesar et al., 2009).

Nos últimos anos pesquisas voltadas a investigação da funcionalidade de alimentos simbióticos indicam haver benefícios clínicos sobre a ingestão não somente dos microrganismos viáveis, mas também dos metabólitos ou componentes da parede celular gerados por estes microrganismos, os pós-bióticos. Alguns autores definem os pós-bióticos como sendo endo e exopolissacarídeos, ácidos graxos de cadeia curta, proteínas da parede celular, algumas vitaminas, ácidos orgânicos e etc. capazes de gerar benefícios a saúde (Lee et al., 2002; Oberg et al., 2011; Konstantinov et al., 2013; Tsilingiri & Rescigno, 2013; Tomar et al., 2015; George et al., 2018; Adebayo-Tayo et al., 2018; Lukic et al., 2018).

Estudos sobre o potencial de fermentação com probióticos de fontes vegetais alternativas às fontes lácteas, vem sendo feitos com o intuito de gerar novos produtos; atender as necessidades do mercado consumidor cada vez mais diversificado; agregar valor às fontes estudadas; reaproveitar resíduos do processamento e endossar o aproveitamento de PANC's e ainda com isso diminuir o impacto ambiental na elaboração de alimentos (Mondragón-Bernal, 2004; Prado et al., 2008; Mondragón-Bernal 2009; Mondragón-Bernal et al., 2010; Nicolesco & Buruleanu, 2010; Nualkaekul & Charalampopoulos (2011); Pereira et al., 2011; Sheela & Suganya (2012); Martins et al., 2013; Wang et al., 2017; Mondragón-Bernal et al., 2017; Evangelista et al., 2017; Teixeira, 2017; Hernández-Torres, 2019).

O Brasil é o maior produtor e exportador de café (*Coffea arabica*) e a região Sul de Minas Gerais é a maior produtora do país. Sua indústria libera enormes quantidades de subprodutos, ricos em carboidratos e proteínas o que vem estimulando seu emprego em diversos estudos que envolvem processos fermentativos (Sera, 2010; Menezes et al., 2013a; Menezes et al., 2013b; Nurfeta, 2010; Murthy & Naidu, 2011; Torres-Macera et al., 2011; Nogueira et al., 2011; Velazquez-Mancera et al., 2011; Bhoite & Murthy, 2014; Murthy & Naidu, 2012; Pleissner et al., 2016; Gurram et al., 2016).

O fruto jerivá (*Syagrus romanzoffiana*) é uma PANC (Planta alimentícia não convencional) nativa brasileira abundante na região de Minas Gerais e sua amêndoa vem sendo explorada quanto a sua composição nutricional comprovando seu elevado teor de proteínas e

outros compostos nutricionais (Coimbra & Jorge, 2016; Silva et al., 2016; Magalhães et al., 2020). Nenhum estudo abordou até hoje seu emprego em processos fermentativos, tornando-o interessante para ser aqui abordado.

O yacon (*Smallanthus sonchifolius*) é segundo alguns autores é uma fonte particularmente abundante de prebióticos (Pedreschi et al., 2003; Ojansivu, et al., 2011), o que explica sua crescente aplicação no desenvolvimento de alimentos simbióticos (Delgado et al., 2010; Moura et al., 2012; Rodrigues et al., 2012; Padilha et al., 2017; Hernández-Torres, 2019).

Desta forma justifica-se o emprego da polpa de café, amêndoas de jerivá e farinha de yacon na elaboração de uma nova bebida simbiótica como principal objetivo deste projeto, para obtenção de uma bebida simbiótica com características físico-químicas que promovam equilíbrio simbiótico e sinérgico entre as matérias-primas e bactérias empregadas, gerando um meio balanceado nutricionalmente e que garanta funcionalidade ao produto elaborado.

## **2. MATERIAL E MÉTODOS**

### **2.1. Preparo e caracterização centesimal das matérias primas**

As matérias primas estudadas neste experimento, que compuseram os meios de fermentação, foram extrato da polpa de café maduro (EPC), extrato da polpa de café funcional (EPC<sub>F</sub>), extrato das amêndoas de jerivá (EAJ) e extrato da farinha de yacon (FrY).

A polpa de café maduro proveniente do Sítio Montes Verdes/Ouro Fino-MG foi obtida por despulpamento dos grãos cereja (Pinhalense, São Paulo, Brasil) seguida por sanitização em solução de peróxido de hidrogênio 0,1:10 (v:v) (Menezes et al., 2013). A polpa de café verde e maduro com potencial antioxidante foi obtida no Departamento de Engenharia/UFLA por metodologias adotadas pelo professor doutor Borém. As amêndoas de jerivá provenientes do Sítio Oliveira/Ouro Fino MG foram obtidas por prensagem das castanhas previamente sanitizadas em solução de peróxido de hidrogênio 0,1:10 (v:v) seguidas por secagem em estufa (105°/24h) (Adaptado de Magalhães et al., 2020) e a farinha de yacon desidratada foi adquirida através de compra junto à empresa Ingredientes Online/São Paulo-SP (Hernández-Torres, 2019). Foram preparados extratos de EPC e EAJ a partir de trituração em água destilada, seguida de filtração em um fino tecido de nylon, e armazenamento em freezer.

Uma caracterização centesimal dos extratos foi realizada segundo métodos da AOAC 2012 quantificando umidade, proteínas, cinzas, fibras, lipídeos e carboidratos totais.

## 2.2. Linhagens probióticas e Preparo do inóculo

As linhagens probióticas estudadas foram *Lactobacillus rhamnosus* (LR-32) (Aché®/Guarulhos-SP) e *Bifidobacterium longum* (BL-04) (Danisco Dupont®/São Paulo-SP) em sua forma liofilizada. Inicialmente as diferentes linhagens foram submetidas a ativação (0,1g + 0,9 mL de água peptonada (0,01%) esterilizada (121°/15min)) seguida por plaqueamento por profundidade (*pour plate*) em ágar MRS (Man Rogosa e Sharpe, 1960) + 0,1% de azul de anilina (Sigma-Aldrich®, São Paulo, Brasil) com incubação de 48h/37°C em condições de aerobiose para LR-32 e anaerobiose para BL-04. Desta forma realizou-se a contagem padrão em placas para determinação da concentração de células em cada linhagem (Mondragón-Bernal, 2004).

Posteriormente foi feito o isolamento das culturas puras de cada linhagem (esgotamento por superfície) e propagação em meio a caldo MRS + 10% L-cisteína + 17,5% solução de ácido ascórbico durante 48h a 37°C, obtendo-se um volume total de 100 mL de cultura estoque mantidas sob congelamento. As mesmas foram descongeladas e submetidas a contagem padrão em placas para cálculo dos volumes de inóculo a serem adicionados nos diferentes meios de fermentação, tomando como base uma contagem inicial de  $5 \times 10^7$  UFC/mL (Mondragón-Bernal, 2004; Teixeira 2017; Hernández-Torres, 2019).

## 2.3. Fermentações e Planejamento Experimental

As fermentações dos diferentes meios definidos em planejamento experimental foram conduzidas em tubos de ensaio em triplicata com volume de meio de 50 mL a 37°C em anaerobiose, durante tempo necessário para que o pH do meio atingisse  $\text{pH} \approx 4,5$ . Foram coletadas amostras em triplicata no tempo inicial e final de fermentação de cada tratamento para análises microbiológicas e físico-químicas (Adaptado de Mondragón-Bernal 2009).

Foi realizada uma estratégia sequencial de planejamentos: Plackett e Burman 12 (PB 12) com 3 repetições no ponto central totalizando 15 ensaios seguido de um Delineamento Composto Central Rotacional (DCCR) (Rodrigues e Iemma, 2014).

No PB12, as variáveis independentes foram o extrato da polpa de café (EPC-% v/v); extrato da polpa de café funcional (EPC<sub>F</sub> %v/v); extrato das amêndoas de jerivá (EAJ %v/v); farinha de yacon (FrY% m/v) e proporção de *Lactobacillus rhamnosus* e *Bifidobacterium longum* (LR/BL). As variáveis respostas foram: tempo de fermentação (t-h); Crescimento total

(Cresc. Total- LogUFC.mL<sup>-1</sup>); Crescimento da *Bifidobacterium longum* (Cresc. BL-LogUFC.mL<sup>-1</sup>); Crescimento da *Lactobacillus rhamnosus* (Cresc. LR-LogUFC.mL<sup>-1</sup>); Consumo de açúcares totais (C<sub>AT</sub>-g/L); Consumo de açúcares redutores (C<sub>AR</sub>-g/L); Produção de exopolissacarídeos (P<sub>EPS</sub>-g/L) e Produção de ácidos totais (P<sub>AT</sub>-g/L). Foram realizadas estimativas dos efeitos das variáveis independentes sobre as respostas, sendo consideradas significativas as que apresentaram p ≤ 0,05 utilizando-se o software Statistica 8.0 (Statsoft, 2008) (Rodrigues e Iemma, 2014).

Na Tabela 1, é apresentada a relação entre os níveis codificados e reais das variáveis independentes do delineamento Plackett e Burman.

Tabela 1 - Relação entre os níveis codificados e reais das variáveis independentes no delineamento Plackett e Burman

Variáveis	Níveis		
	-1 (%)	0 (%)	+1 (%)
EPC	0	15	30
EPC <sub>F</sub>	0	5	10
EAJ	0	17,5	35
LR/BL	0:100(LR:BL)	50:50(LR:BL)	100:0(LR:BL)
FrY	5	15	25

Nota: EPC: Extrato da polpa de café; EPC<sub>F</sub>: Extrato da polpa de café funcional; EAJ: Extrato das amêndoas de jerivá; LR/BL: Proporção *Lactobacillus rhamnosus*/*Bifidobacterium longum*; FrY: Farinha de Yacon.

Fonte: Do autor, 2021.

## 2.4. Delineamento Experimental DCCR

Após análise dos resultados do delineamento PB 12, foi conduzido um Delineamento Composto Central Rotacional (DCCR) com duas variáveis independentes: EPC (%v/v) e FrY (%m/v), totalizando 11 tratamentos, sendo as variáveis EPC<sub>F</sub> e EAJ fixados em seus respectivos pontos centrais do PB12 (Rodrigues e Iemma, 2014). As variáveis dependentes do DCCR foram: Tempo (t-h); Crescimento total (Cresc.Total- LogUFC.mL<sup>-1</sup>); Crescimento de Bifidobactéria (Cresc. BL- LogUFC.mL<sup>-1</sup>); Crescimento de Lactobacilo (Cresc. LR-LogUFC.mL<sup>-1</sup>); Consumo de Açúcares Totais (C<sub>AT</sub> - g/L); Consumo de Açúcares Redutores (C<sub>AR</sub> - g/L); Produção de Exopolissacarídeos (P<sub>EPS</sub> - g/L); Produção de Ácidos Totais (P<sub>AT</sub>-g/L); Parâmetros de cor: L\*, a\* e b\* e Turbidez Final. Os resultados foram analisados utilizando-se o software Statistica 8.0 (Statsoft, 2008) (Rodrigues e Iemma, 2014).

Na Tabela 2 é apresentada a relação entre valores codificados e reais das variáveis independentes usadas no DCCR

Tabela 2 - Relação entre valores codificados e reais das variáveis independentes utilizadas no DCCR

Variáveis	Níveis				
	<b>-1,41 (%)</b>	<b>-1(%)</b>	<b>0(%)</b>	<b>+1(%)</b>	<b>+1,41(%)</b>
FrY (x1)	5%	7,9%	15%	22,08%	25%
EPC (x2)	0%	4,36%	15%	25,64%	30%

Legenda: EPC: Extrato da polpa de café; FrY: Farinha de Yacon.

Fonte: Do Autor, 2021.

Os coeficientes de regressão das variáveis independentes para cada variável resposta foram determinados e a análise de variância ANOVA foi realizada a 95% de confiança ( $p \leq 0,05$ ), sendo ajustados modelos de regressão polinomial de segunda ordem como descrito na Equação 1 seguinte.

$$Y = \beta_0 + \sum_{i=1}^k \beta_i X_i + \sum_{i=1}^k \beta_{ii} X_i^2 + \sum_{i \neq j}^k \beta_{ij} X_i X_j + \varepsilon \quad (1)$$

Onde  $\beta_0$  é a constante do modelo;  $\beta_i$  é o coeficiente linear;  $\beta_{ii}$  é o coeficiente quadrático;  $\beta_{ij}$  é o coeficiente de interação;  $X_i$  e  $X_j$  são as variáveis independentes;  $k$  é o número de fatores testados ( $k=2$ ) e  $\varepsilon$  é o erro experimental. A partir dos modelos ajustados foram geradas superfícies de resposta e curvas de contorno com auxílio do software Statistica 8.0 (Statsoft, 2008) (Rodrigues e Iemma, 2014).

Os modelos para tempo (t-h); crescimento total ( $C_T - \text{LogUFC.mL}^{-1}$ ); crescimento de LR ( $C_{LR} - \text{LogUFC.mL}^{-1}$ ); crescimento de BL ( $C_{BL} - \text{LogUFC.mL}^{-1}$ ); consumo de açúcares totais ( $C_{AT} - \text{g/L}$ ); produção de ácidos totais ( $P_{AT} - \text{g/L}$ ) e parâmetros de cor:  $L^*$ ,  $a^*$  e  $b^*$ , foram obtidos e para os que tiveram bom ajuste na ANOVA, a 5% de significância e para estes foram geradas as superfícies de resposta.

#### 2.4.1 Validação dos modelos

Os modelos ajustados foram validados através da execução de dois experimentos em triplicata com teores de EPC (%v/v) e FrY (%m/v) dentro da região do ótimo observada. A validação foi feita pela comparação entre os valores experimentais e preditos pelos modelos ajustados e cálculo do erro relativo.



## **2.5. Medida do pH, Acidez titulável (AT) e Produção de Ácidos Totais (P<sub>AT</sub>)**

O pH foi medido em potenciômetro MS Tecnopon Instrumentação (AOAC, 2012). A acidez titulável (AT) foi medida diluindo-se 5 mL da amostra em água destilada seguido de titulação com solução de NaOH 0,1 mol. L<sup>-1</sup>, utilizando-se fenolftaleína 1% como indicador (AOAC (2012)). A produção de AT (P<sub>AT</sub>) se deu pela diferença entre a produção de ácidos no tempo final (AT<sub>tf</sub>) e tempo inicial das fermentações (AT<sub>t0</sub>) (Mondragón-Bernal, 2004).

## **2.6. Contagem Padrão em Placas e Crescimento Celular**

As contagens celulares das amostras coletadas ao longo das fermentações foram determinadas por plaqueamento em profundidade em Ágar MRS + 0,1% de azul de anilina, em triplicada, a 37°C durante 72h em condições de aerobiose e anaerobiose em jarras herméticas com geradores de anaerobiose (Anaerobac Probac, São Paulo, Brasil).

As Contagens Totais (C<sub>T</sub>) (LogUFC.mL<sup>-1</sup>) e Contagens Diferenciadas (C<sub>D</sub>) (LogUFC.mL<sup>-1</sup>) foram obtidas por contagem padrão em placas, sendo a contagem de Bifidobactérias calculada como a diferença entre Contagem Total (condição de anaerobiose) e a Contagem de Lactobacilos (condição de aerobiose). Foram determinados os crescimentos celulares (LogUFC.mL<sup>-1</sup>) através da diferença entre as contagens verificadas no tempo final e inicial de fermentação (Cresc.LR; Cresc.BL ou Cresc.Total= Contagem<sub>tf</sub> – Contagem<sub>t0</sub>) (Mondragón-Bernal, 2004).

## **2.7. Determinação de Açúcares Totais (AT), Açúcares Redutores (AR) e Consumo de Açúcares (C<sub>AT</sub> e C<sub>AR</sub>)**

Inicialmente foi feita a remoção de células e proteínas dos meios avaliados através da adição de 0,10 mL de ácido cítrico 1M a cada 1,0 mL de amostra posteriormente centrifugadas a 3000 g durante 30 minutos e o sobrenadante foi direcionado para quantificação de açúcares afim de se evitar interferências nos resultados.

Os AT e AR foram determinados através do método do ácido 3,5-dinitrossalicílico (DNS) (Miller, 1959), sendo a absorbância medida em espectrofotômetro Fento 700S com comprimento de onda de 540 nm, utilizando curvas padrões de sacarose (3g/L) e glicose (1g/L) no intervalo de 0-3g e 0-1g respectivamente. A taxa de consumo de açúcares totais (%AT) e consumo de açúcares redutores (%AR) foi medida de acordo com a diferença entre os resultados

verificados ao início e final das fermentações ( $C_{AT}$  ou  $C_{AR} = CA_{t_0} - CA_{t_f}$ ) (Mondragón-Bernal, 2004).

## **2.8. Determinação do teor de Exopolissacarídeos (EPS) e Produção de EPS ( $P_{EPS}$ )**

Inicialmente foi feita a remoção de células e proteínas dos meios avaliados através da adição de 0,10 mL de ácido cítrico 1M a cada 1,0 mL de amostra posteriormente centrifugadas a 3000 g durante 30 minutos. O sobrenadante foi direcionado às quantificações de açúcares, a fim de se evitar interferências nos resultados.

Para extração do EPS bruto, o sobrenadante foi aquecido (100°C/10min) para inativação enzimática. Os EPS foram precipitados (2 volumes de etanol 95% resfriado durante 12 h a 4°C) seguidos de centrifugação (2500g/20min), sendo o sobrenadante descartado e o precipitado ressuspensionado em etanol 95% repetindo-se o mesmo procedimento. Em seguida promoveu-se a evaporação do etanol residual em estufa B.O.D. (3h/60°C), sendo por fim o conteúdo ressuspensionado em água destilada (1mL) e direcionado a análise.

A quantificação de EPS se deu pelo método de Antrona (Trevelyan e Harrison, 1952), sendo as absorbâncias medidas em espectrofotômetro Fento 700S com comprimento de onda de 620nm, utilizando uma curva padrão de goma xantana (0,04g/L) no intervalo de 0-0,04g. A produção de EPS ( $P_{EPS}$ -g/L) foi determinada pela diferença entre a produção de EPS no tempo final e inicial de fermentação ( $P_{EPS} = EPS_{t_f} - EPS_{t_0}$ ), usando metodologia adaptada de Savadogo et al., 2004 e Grattepanche et al., 2007 por Mondragón Bernal et al., 2017.

## **2.9. Determinação dos parâmetros de cor $L^*$ , $a^*$ , $b^*$**

Os parâmetros de cor  $L^*$ ,  $a^*$ ,  $b^*$  foram definidos no sistema Cielab pelo equipamento espectrofotômetro de bancada CM-5 (Konica Minolta, Sensing Americas) com iluminante D65 e ângulo de iluminação de 10° nas amostras de tempo final de fermentação (Adaptado de Migot et al., 2017).

## **2.10. Determinação da Turbidez**

A medida da turbidez se deu para amostras do tempo inicial e final de fermentação através de medidas de absorbância a 600 nm em espectrofotômetro Fento 700S (Adaptado de Mondragón-Bernal, 2009).

## **2.11. Determinação de ácidos orgânicos por HPLC**

Previamente a avaliação de ácidos orgânicos por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) todas as amostras de tempo inicial e final de fermentação passaram por pré-tratamentos envolvendo a remoção de células e proteínas dos meios avaliados através da adição de 0,10 mL de ácido cítrico 1M a cada 1,0 mL de amostra posteriormente centrifugadas a 3000 g durante 30 minutos (Mondragón-Bernal et al., 2009). Promoveu-se também a remoção de gorduras presentes no meio misturando-se partes iguais das amostras e n-hexano (1:1) seguido de agitação por 30 segundos e separação da fração não hexânica (desengordurada), direcionando a alíquota a uma repetição do mesmo processo que se finalizou após centrifugação a 7000 rpm por 20 min a 4°C (Santos et al., 2014).

A determinação da concentração (g/L) dos ácidos oxálico, cítrico, málico, láctico e acético nas amostras foi feita em HPLC 1260 Infinity II com bomba quaternária, amostrador automático, compartimento termostaticado de coluna, detector UV-Vis, índice de refração e fluorescência – Software Open LAB CDS 2 da marca Agilent. Soluções analíticas de ácidos oxálico, cítrico, málico, tartárico, láctico e acético foram preparadas.

O método cromatográfico foi realizado nas seguintes condições: Coluna + pré-coluna: Supelcogel C-6H<sub>10</sub> (300 mm x 7,8 mm D.I.) a 50°C monitorada por espectrofotometria de UV a 210 nm de comprimento de onda. Fase móvel: 10 mM solução de Ácido Perclórico 0,23% a uma taxa de fluxo constante de 0,6 mL/min como fase móvel. Detector U.V (Jham et al., 2002). A injeção foi realizada com variação de fluxo.

## **2.12. Estudo da viabilidade celular por Citometria de Fluxo**

O preparo das amostras para avaliação em citometro de fluxo FACS Calibur™ (BD, Biosciences, San Jose, CA, USA), iniciou-se pela centrifugação das células na centrífuga de marca e modelo Sigma Laboratory Centrifuges 4k-15 (Newport Pagnell, Inglaterra) contidas no meio de fermentação a 3000 g/15 min, a 4°C. O sobrenadante foi retirado e o concentrado de células lavado duas vezes com tampão fosfato (0,1 M, pH 8,0) e ressuspenso em 10 mL do mesmo tampão. A marcação se deu sobre 1 mL desta suspensão suplementada com 0,5 mL de CFDA-SE (Carboxifluoresceína Diacetato Succinimidil Ester) seguida de incubação no escuro à temperatura ambiente por 10 min, logo depois a suspensão foi novamente centrifugada

nas mesmas condições, ressuspensa em 1 mL de tampão fosfato, suplementada com 3,74 mL de PI (Iodeto de Propídio) e incubada novamente no escuro à temperatura ambiente durante 10 minutos (Shengbin et al., 2017). As leituras foram realizadas dentro de 24h após preparo das amostras.

As amostras previamente tratadas foram então levadas a leituras no equipamento Citômetro de Fluxo FACS Calibur™ (BD, Biosciences, San Jose, CA, USA), sendo os canais de leitura previamente limpos pelo uso da solução FACS Rinse (BD, Biosciences, San Jose, CA, USA) (Shengbin et al., 2017) e previamente ajustados (Canal FL2-PI (injúria celular) a 400V e Canal FL1-CFDA (viabilidade) a 600V) determinando a faixa de captação do laser, a combinação de tamanho (FSC - Forward Scatter) e granulosidade (SSC - Side Scatter) utilizada para discriminar o tamanho dos microrganismos avaliados.

Foi avaliada qualitativamente a concentração de microrganismos viáveis (%CelsVivas), não viáveis (%CelsMortas) e injuriados (%CelsInjuriadas) das amostras coletadas no tempo inicial (t0) e final (tf) de fermentação em triplicata, sendo avaliados 50.000 eventos. Foram feitas avaliações pelo software FlowJo® 10.0.6 que permite determinar o melhor enquadramento de distribuição celular de cada tratamento ou população alvo do estudo, geração dos histogramas e porcentagens de eventos concentrados em cada quadrante dos histogramas. No quadrante 1 (Q1) estão concentradas as células coradas apenas com CFDA, indicando alta atividade de esterase e membrana celular intacta (células vivas). No quadrante 2 (Q2) estão as células marcadas com ambos os corantes (PI e CFDA-SE), indicando pequeno dano na membrana, porém ainda com atividade de esterases, representando as células injuriadas. O quadrante 3 (Q3) representa células coradas apenas com PI, indicando que a membrana foi comprometida e que não existe atividade de esterase detectável, ou seja, células mortas. E o quadrante 4 (Q4) representa as células que não sofreram marcação (Adaptado de Bernucci, 2017).

## **2.13. Avaliações Funcionais**

### **2.13.1. Teste de digestibilidade *in vitro***

Os testes de digestibilidade *in vitro* foram conduzidos em tubos de ensaio nos quais foram adicionados 1,0 mL de amostra e 9 mL de saliva artificial. Esta mistura foi agitada em vortex durante 10 s e incubada por 5 min em banho a 37°C seguido de retirada de amostra para análises.

Posteriormente foram adicionados 10 mL do suco gástrico seguido novamente de incubação a 37 °C, amostras foram retiradas após uma e três horas de digestão. Após três horas foi realizada a centrifugação, o sobrenadante descartado e adicionados 5mL de suco intestinal e 5 mL do suco pancreático ao meio prosseguindo-se a digestão a 37°C, foram retiradas amostras nos tempos de 4 e 8 horas para análises. Todas as digestões foram realizadas em triplicata nas amostras de tempo inicial e final de fermentação dos testes de validação. As análises foram feitas para verificação da resistência às condições do trato digestório por meio da contagem padrão em placa em meio Ágar MRS nas amostras de tempo inicial e final de fermentação, para controle da perda de viabilidade dos microrganismos (Hernández-Torres, 2019).

Os sucos digestivos artificiais foram elaborados seguindo metodologias adaptadas de Bernucci (2017); Mondragón-Bernal (2009) e Hernández-Torres, 2019.

- Saliva: Foi preparada com lisozima (atividade de hidrólise nas ligações  $\alpha$ -1,4 entre a N-acetilglicosamina e N-acetilmurâmico do peptidoglicano da parede celular de bactérias gram-positivas) 1g/L de clara de ovo (Interprise, São Paulo, Brasil),  $\alpha$ -amilase (catalisam hidrólise de ligações  $\alpha$ -1,4 glicosídicas de polissacarídeos) 0,3 g/100mL (Termamyl®, Novosyme, Dinamarca) e tampão bicarbonato de sódio - carbonato de sódio 1.M pH 6,0.
- Suco gástrico: HCl 0,08 M pH 1,2; com 0,32g/L de pepsina (Affymetrix, Thermo Fisher Scientific, California, USA) (capaz de hidrolisar algumas, mas não todas as classes de ligações peptídicas, agindo essencialmente sobre as ligações que envolvem o grupo carboxilo dos resíduos aromáticos (fenilalanina, triptofano e tirosina) e menos rapidamente em ligações que envolvem outros aminoácidos) e 0,2g/L de lipase de pâncreas suína - Tipo II (Sigma Aldrich, São Paulo, Brasil) (catalisam a hidrólise de triglicerídeos e a síntese de ésteres formados a partir de glicerol e ácidos graxos de cadeia longa.).
- Suco intestinal: Foi preparado com sais biliares 0,33 g/L (Sigma Aldrich, São Paulo, Brasil) e invertase comercial 0,25 g/L (Sigma Aldrich, São Paulo, Brasil) (catalisam a hidrólise altamente exotérmica e irreversível da sacarose em glicose e frutose). Foi utilizada solução tampão bicarbonato de sódio - carbonato de sódio 1.M pH 8,0.
- Suco pancreático: Foram utilizadas pancreatina 0,83 g/L de pâncreas suíno (Darmstadt, Germany, USA) (promovem a hidrólise de gorduras, carboidratos e proteínas, respectivamente) e lipase 0,02 g/L de pâncreas suína - Tipo II (Sigma Aldrich, São

Paulo, Brasil). Foi utilizada solução tampão bicarbonato de sódio - carbonato de sódio 1.M pH 8,0.

Todos os sucos digestivos foram esterilizados a frio através de filtros de membrana com diâmetro de poro de 0,2 µm (Chromafil-Induslab, Curitiba, Brasil) e em condições estéreis. Todos foram tamponados com solução bicarbonato de sódio-carbonato de sódio 1 M, nas proporções correspondentes ao pH característico de cada suco digestivo.

### **2.13.2. Teste de hidrofobicidade (Aderência)**

O teste de hidrofobicidade foi feito de acordo com metodologia adotada por Hernández-Torres (2019) e Mishra e Prasad (2005), usando como solvente xileno (Synth, São Paulo, Brasil), um hidrocarboneto aromático.

A hidrofobicidade foi calculada conforme metodologia de Mishra e Prasad (2005) para as linhagens puras, o inóculo preparado e para as células centrifugadas das amostras experimentais para validação. As culturas foram cultivadas em caldo MRS a 37°C/ 24 h seguidas de centrifugação a 1008 g/ 15 min. O concentrado foi lavado duas vezes com tampão fosfato 0,1 M (pH = 7,0) seguido de ressuspensão das células no mesmo tampão fosfato para se proceder a medida da absorbância inicial ( $A_0$ ) a 540 nm em espectrofotômetro Femto 700S.

Em tubos de ensaio foram adicionados 5 mL da suspensão celular em solução de tampão fosfato 0,1 M adicionados de 1 mL do hidrocarboneto xileno e misturados com auxílio de agitador tipo vórtex Vision Scientific KMC-1300V a alta velocidade durante 2 min. Em seguida os tubos foram incubados durante 1h a 37°C para que ocorresse a separação das fases e com o auxílio de uma pipeta Pasteur a fase inferior aquosa foi coletada e inserida em cubeta de quartzo para leitura da absorbância final ( $A_f$ ) a 540 nm. Quanto menor a absorbância na fase aquosa maior é a hidrofobicidade da superfície celular (H%), e quanto maior a hidrofobicidade maior a capacidade de aderência da(s) célula(s) ao epitélio intestinal, assim se determinou a capacidade das bactérias probióticas presentes na bebida elaborada em se aderir ao epitélio intestinal humano. A hidrofobicidade foi calculada de acordo com a equação 2 apresentada a seguir:

$$H\% = \frac{A_0 - A_f}{A_0} \times 100 \quad (2)$$

### 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

#### 3.1. Caracterização centesimal das matérias primas

A Tabela 3 demonstra os resultados da composição centesimal com base na matéria integral dos extratos da polpa de café, amêndoas de jerivá e farinha de yacon. Algumas bactérias probióticas como os lactobacilos são capazes de digerir, além dos carboidratos biodisponíveis, alguns nutrientes como proteínas (Wang et al., 2017). Neste sentido verifica-se que foi possível formular um meio balanceado com elevados teores de proteínas do EAJ e da FrY e carboidratos do EPC e FrY. Outros autores também constataram elevada concentração de carboidratos totais na polpa do café arábica (Menezes, 2013; Murthy e Naidu, 2012; Torres-Macera et al., 2011). Coimbra e Jorge (2011) detectaram elevada concentração de proteínas das amêndoas do jerivá. Bertolo (2017) constatou elevado teor de carboidratos e proteínas na batata yacon *in natura* e Pedreschi (2003) constatou ser a batata yacon, uma excelente fonte de prebióticos como frutooligossacarídeos (FOS) e inulina.

Tabela 3 - Composição em base integral dos extratos de polpa de café, amêndoas de jerivá e farinha de yacon

Componentes	EPC (% m/v)	EAJ (%m/v)	FrY (%m/m)
Umidade	92,12 ± 0,01	92,12 ± 0,21	4,97 ± 0,00
Gordura	0,05 ± 0,01	6,08 ± 3,30	0,19 ± 0,00
Proteínas	0,56 ± 0,01	1,71 ± 2,30	4,06 ± 1,00
Fibra Bruta	0,04 ± 0,00	0,002 0,02	9,83 ± 0,00
Cinzas	0,00 ± 0,00	0,002 ± 0,00	0,03 ± 0,00
Carboidratos Digeríveis	7,16 ± 0,00	0,07 ± 0,00	80,93 ± 0,00

Fonte: Do Autor, 2021.

#### 3.2. Delineamento experimental Plackett e Burman 12 (PB12) para análise de variáveis significativas na formulação da bebida funcional.

A Tabela 4 reúne os resultados das variáveis respostas obtidas no PB 12 para determinação do efeito das variáveis extrato da polpa de café (EPC-% v/v); extrato da polpa de café funcional (EPC<sub>F</sub>-% v/v); extrato das amêndoas de jerivá (EAJ-%v/v); farinha de yacon (FrY-% m/v) e proporção de bifidobactéria e bactéria láctica na formulação e funcionalidade potencial da bebida simbiótica.

Ao longo das fermentações, foi feito o monitoramento do tempo e do pH dos tratamentos. Com pH $\approx$ 4,5 garante-se um bom desenvolvimento celular e o controle de microrganismos patogênicos ou deteriorantes, sem causar problemas sensoriais na bebida. Esse pH é atingido após a geração de ácidos orgânicos em concentrações adequadas. Outros metabólitos produzidos pelas bactérias probióticas utilizadas na fermentação dos extratos, conhecidos como pós probióticos, também são de interesse, sendo algumas enzimas, peptídeos, endo e exopolissacarídeos, proteínas, vitaminas, dentre outros compostos considerados benéficos à saúde segundo Konstantinov et al. (2013). Foi avaliada a cinética de consumo de substrato, crescimento celular, e geração de produtos desejáveis, buscando-se também um baixo tempo de fermentação como focos principais deste estudo.

Tabela 4 - Resultados dos ensaios do planejamento experimental PB 12

Trats.	EPC (%v:v)	EPC <sub>F</sub> (%v:v)	EAJ (%v:v)	Respostas								
				LR/BL (%)	FrY (%m:v)	Tempo (h)	CrsLR (LogUFC.L <sup>-1</sup> )	CrsBL (LogUFC.L <sup>-1</sup> )	C <sub>ART</sub> (g/L)	C <sub>AR</sub> (g/L)	P <sub>EPS</sub> (g/L)	P <sub>AT</sub> (g/L)
1	1 (15)	-1 (0)	1 (17,5)	-1 (0)	-1 (2,5)	6	4,78	0,00	13,93	8,01	-0,02	0,69
2	1 (15)	1 (5)	-1 (0)	1 (100)	-1 (2,5)	16	0,00	3,98	3,50	7,84	0,75	0,15
3	-1 (0)	1 (5)	1 (17,5)	-1 (0)	1 (12,5)	6	4,90	0,00	15,70	36,00	0,35	0,96
4	1 (15)	-1 (0)	1 (17,5)	1 (100)	-1 (2,5)	14	0,00	4,42	18,86	3,15	0,41	0,51
5	1 (15)	1 (5)	-1 (0)	1 (100)	1 (12,5)	21	0,00	5,09	23,67	25,86	0,53	1,08
6	1 (15)	1 (5)	1 (17,5)	-1 (0)	1 (12,5)	30	4,52	0,00	33,62	33,04	-0,00	0,54
7	-1 (0)	1 (5)	1 (17,5)	1 (100)	-1 (2,5)	19	0,00	4,79	12,54	17,08	0,22	0,60
8	-1 (0)	-1 (0)	1 (17,5)	1 (100)	1 (12,5)	16	0,00	4,08	6,00	6,50	0,18	0,49
9	-1 (0)	-1 (0)	-1 (0)	1 (100)	1 (12,5)	16	0,00	4,99	11,43	43,22	0,73	0,99
10	1 (15)	-1 (0)	-1 (0)	-1 (0)	1 (12,5)	28	4,90	0,00	10,81	22,99	-0,02	0,90
11	-1 (0)	1 (5)	-1 (0)	-1 (0)	-1 (2,5)	34	4,34	0,00	10,18	4,50	-0,06	0,45
12	-1 (0)	-1 (0)	-1 (0)	-1 (0)	-1 (2,5)	21	4,05	0,00	9,51	2,88	-0,013	0,40
13 (pc)	0 (7,5)	0 (2,5)	0 (8,75)	0 (50)	0 (7,5)	8	4,83	0,09	68,02	40,49	0,95	0,90
14 (pc)	0 (7,5)	0 (2,5)	0 (8,75)	0 (50)	0 (7,5)	8	4,89	0,06	64,34	41,08	0,95	0,93
15 (pc)	0 (7,5)	0 (2,5)	0 (8,75)	0 (50)	0 (7,5)	8	4,88	0,07	60,89	40,52	0,95	0,93

Legenda: Tratamentos; CrsTotal: Crescimento total; CrsLR: Crescimento de *Lactobacillus rhamnosus*; CrsBL: Crescimento de *Bifidobacterium longum*; C<sub>ART</sub>: Consumo de açúcares redutores totais; C<sub>AR</sub>: Consumo de açúcares redutores; P<sub>EPS</sub>: Produção de exopolissacarídeos; P<sub>AT</sub>: Produção de ácidos totais; pc: ponto central.

Fonte: Do Autor, 2021.

Após plaqueamento das amostras do tempo inicial e final verificou-se contagens totais em torno de 8 LogUFC.mL<sup>-1</sup> e 13 LogUFC.mL<sup>-1</sup> respectivamente, exceto para os tratamentos 2, 8 e 12 com contagens finais médias de 12 LogUFC.mL<sup>-1</sup>. Notou-se um aumento de até 5 LogUFC.mL<sup>-1</sup> no decorrer das fermentações avaliando-se os crescimentos celulares de LR (CrsLR) e de BL (CrsBL) na Tabela 4, indicando um bom crescimento das bactérias na maioria dos tratamentos estudados. Hernández-Torres (2019) obteve crescimento de até 5 LogUFC.mL<sup>-1</sup> da mistura de *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei*, *Lactobacillus rhamnosus*,



*Lactobacillus acidophilus* e *Bifidobacterium longum* em meios contendo farinha de yacon (0-12g/100mL) e amendoim (2,8-11,2g/100mL). Mondragón-Bernal et al. (2017) obteve um crescimento de até 3 LogUFC.mL<sup>-1</sup> da mistura de *Lactobacillus rhamnosus*, *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus paracasei* subsp *paracasei* e *Bifidobacterium longum* em diferentes meios formulados a base de extrato de soja hidrossolúvel adicionado de FOS e/ou polidextrose com e sem sacarose.

Com relação ao consumo de açúcares totais (C<sub>AT</sub>) e consumo de açúcares redutores (C<sub>AR</sub>), nota-se no geral, que houve bom desempenho no consumo de substratos na maioria dos tratamentos, sendo que no tratamento do ponto central foi verificado maior consumo de AT (g/L) (68; 64,3 e 60,9, respectivamente) e em relação ao consumo de AR (g/L) foram o tratamento 9 (43,2) e os ensaios do ponto central (40,5; 41,1 e 40,5). Os tratamentos que apresentaram menor consumo de AT (g/L) e também de AR (g/L) foram 2 (A<sub>RT</sub>=3,5 e A<sub>R</sub>=7,8), 8 (A<sub>RT</sub>= 6,0 e A<sub>R</sub>=6,5) e 12 (A<sub>RT</sub>=9,5 e A<sub>R</sub>=2,9). Observa-se que o crescimento celular aumenta concomitantemente ao consumo de carboidratos, frente a essa afirmação, é relevante considerar o efeito sinérgico e benefício mútuo no crescimento entre as bactérias aqui estudadas em mistura (LR e BL) visto que as bifidobactérias têm atividade hidrolítica em oligossacarídeos como inulina, biodisponibilizando açúcares para os lactobacilos, e em contrapartida os lactobacilos biodisponibilizam peptídeos e aminoácidos para as bifidobactérias devido a sua atividade proteolítica, atividades favorecidas pelos substratos presentes no meio formulado (açúcares e proteínas) (Vinderola et al., 2000; Zhuge et al, 2021). Hernandez-Torres (2019) verificou haver bom consumo de A<sub>RT</sub> (máx. 20,6g/L) e A<sub>R</sub> (máx. 20,8g/L) na fermentação de meio contendo farinha de yacon (0-12g/100mL) e amendoim (2,8-11,2g/100mL) por *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei*, *Lactobacillus rhamnosus*, *Lactobacillus acidophilus* e *Bifidobacterium longum*.

Estudos têm reportado a importância industrial e sobre a saúde humana dos EPS (Adebayo-Tayo et al., 2018). Na produção de EPS por bactérias probióticas, deve-se considerar haver reações complexas entre todos os polímeros e açúcares presentes no meio de fermentação (proteínas, prebióticos e EPS formado), e ainda a influência da composição do meio de fermentação, as particularidades das bactérias produtoras e as concentrações dos sais de Mg<sup>2+</sup> e Mn<sup>2+</sup> pois são essenciais para o desenvolvimento de lactobacilos e produção de EPS (Macedo et al., 2002; Mondragón-Bernal et al, 2017). Mende et al. (2016) provaram que a interação entre diferentes parâmetros estruturais do meio fermentativo pode afetar a eficácia de produção

de EPS. Assim a avaliação da composição e demais características físico-química dos EPS detectados neste estudo devem ser melhor investigadas em estudos futuros.

Nota-se não haver uma elevada produção de EPS ( $P_{EPS}$ ) nos tratamentos aqui estudados (máximo de 0,9 g/L para os pontos centrais). Esses resultados equiparam-se aos teores encontrados por Li et al. (2014) que obtiveram produção de até 0,635 g/L ao fermentar extrato de soja pela bactéria *Lactobacillus rhamnosus* e Savadogo et al. (2004) que obteve até 0,8g/L de EPS em meio a caldo MRS fermentado por *Streptococcus thermophilus*.

Ao avaliar a produção de ácidos totais ( $P_{AT}$  (g/L)), verifica-se haver produção de ácidos tituláveis na mesma proporção em que ocorre desenvolvimento celular pelo consumo de substratos, sendo que no tratamento 5 houve maior produção (1,08) e no tratamento 2 menor produção (0,15). Hernández-Torres (2019) obteve produção de até 2,8 g/L na fermentação de meios contendo farinha de yacon (0-12g/100mL) e amendoim (2,8-11,2g/100mL) por ação da mistura de *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei*, *Lactobacillus rhamnosus*, *Lactobacillus acidophilus* e *Bifidobacterium longum*.

Todos os resultados ou variáveis respostas apresentadas pela Tabela 4 foram tratados estatisticamente e foram estimados os efeitos das cinco variáveis independentes nas respostas, a 90% de confiança ( $p < 0,1$ ) como demonstrado pela Tabela 5.

Tabela 5 - Estimativa de efeitos para CrsLR (LogUFC.mL<sup>-1</sup>), CresBL (LogUFC.mL<sup>-1</sup>),  $C_{AR}$  (g/L),  $P_{EPS}$  (g/L) e  $P_{AT}$  (g/L) no PB12

Variável	CresLR		CresBL		$C_{AR}$		$P_{EPS}$		$P_{AT}$	
	Efeito (LogUFC.mL <sup>-1</sup> )	p-valor	Efeito (LogUFC.mL <sup>-1</sup> )	p-valor	Efeito (g/L)	p-valor	Efeito (g/L)	p-valor	Efeito (g/L)	p-valor
Média	<b>2,82</b>	<b>0,00</b>	<b>1,84</b>	<b>0,00</b>	<b>22,21</b>	<b>0,00</b>	<b>0,39</b>	<b>0,00</b>	<b>0,70</b>	<b>0,00</b>
EPC	0,19	0,80	-0,06	0,92	-1,54	0,86	0,03	0,87	-0,00	0,97
EPC <sub>F</sub>	0,03	0,96	0,06	0,93	6,25	0,49	0,08	0,71	-0,03	0,82
EAJ	0,18	0,81	-0,12	0,85	-0,58	0,94	-0,12	0,59	-0,03	0,85
LR/BL	<b>-4,62</b>	<b>0,00</b>	<b>4,56</b>	<b>0,00</b>	-0,62	0,94	<b>0,43</b>	<b>0,09</b>	-0,02	0,90
FrY	0,22	0,77	0,16	0,81	<b>20,69</b>	<b>0,04</b>	0,08	0,72	<b>0,36</b>	<b>0,04</b>

Legenda: CresLR: Crescimento da *Lactobacillus rhamnosus*; CresBL: Crescimento da *Bifidobacterium longum*; EPC: Extrato da polpa de café; EPC<sub>F</sub>: Extrato da polpa de café funcional; EAJ: Extrato das amêndoas de jerivá; LR/BL: Proporção *Lactobacillus rhamnosus*/*Bifidobacterium longum*; FrY: Farinha de Yacon; p: probabilidade. Nota: Efeitos significativos a  $p < 0,100$ . EPC (%m/v); EPC<sub>F</sub> (%m/v); EAJ (%m/v); LR/BL (LogUFC.mL<sup>-1</sup>); FrY (%m/v).

Fonte: Do Autor, 2021.

Ao avaliar a estimativa de efeitos sobre as respostas tempo e consumo de açúcares redutores totais ( $C_{AT}$ ) foi verificado não haver efeito significativo de nenhuma das cinco variáveis independentes estudadas.

Houve efeito significativo positivo da FrY sobre o  $C_{AR}$ , indicando que quanto maior a concentração da FrY maior o  $C_{AR}$ , sendo este um dos motivos pelos quais a FrY foi uma variável levada a estudo para o DCCR.

Verifica-se haver efeito significativo positivo da proporção de LR/BL sobre a  $P_{EPS}$ , indicando que quanto maior a concentração da *Bifidobacterium longum* (BL) no meio, maior a produção de EPS e por este motivo para o DCCR optou-se em fixar maiores concentrações de BL (75%) e menores de LR (25%). O EAJ teve suas concentrações fixadas no ponto central aqui estudado (17,5%) para experimentos do DCCR, uma vez verificado que apesar de não ser significativo, esta variável gerou efeito negativo considerável sobre o tempo, indicando que quanto maior sua concentração no meio menor o tempo de fermentação e este é um dos objetivos a se alcançar neste projeto.

Em se tratando da avaliação sobre a  $P_{AT}$ , verifica-se que a FrY apresenta efeito significativo positivo sobre esta resposta, indicando que quanto maior o teor de FrY no meio de fermentação maior a  $P_{AT}$ , e por este motivo também a FrY foi uma das variáveis levadas a estudo para o DCCR.

O teor de EPC, apesar de não apresentar efeito significativo sobre nenhuma das respostas aqui avaliadas, foi a segunda variável escolhida para o DCCR, por ser rico em carboidratos e outros nutrientes essenciais para a fermentação, podendo ainda agregar pontos positivos no que diz respeito aos efeitos sensoriais do produto, além do objetivo de aproveitá-lo, uma vez que é um subproduto gerado em grandes volumes no Brasil.

### 3.3. DCCR

A partir dos dados apresentados pela Tabela 6, nota-se com relação ao tempo, que os Tratamentos 1 e 7 foram mais rápidos (19,5h) e os Tratamentos 5 e 6 os mais longos (20,4h) para conclusão da fermentação. Com respeito ao tempo, foi verificado que o teor de extrato de polpa de café (EPC) exerceu efeito significativo e positivo sobre o tempo de fermentação.

Em relação ao crescimento total das bactérias ( $CrescTotal$ ), observou-se que o crescimento foi maior nos ensaios do ponto central, ensaio 9 com 5,1 LogUFC.mL<sup>-1</sup>; ensaio 10 com 5,3 LogUFC.mL<sup>-1</sup> e 11 com 5,1 LogUFC.mL<sup>-1</sup> e menor para o Tratamento 6 (4,1

LogUFC.mL<sup>-1</sup>). O Crescimento de LR também foi maior nos pontos centrais, ensaios 9 (5,29 LogUFC.mL<sup>-1</sup>); 10 (5,33 LogUFC.mL<sup>-1</sup>) e 11 (5,28 LogUFC.mL<sup>-1</sup>) e menor para o Tratamento 6 (4,31 LogUFC.mL<sup>-1</sup>). Verificou-se também que a farinha de yacon (FrY) exerceu efeito significativo e negativo sobre o crescimento de LR. Mesmo comportamento foi observado para crescimento de BL, que também foi maior nos pontos centrais: ensaios 9 (5,02 LogUFC.mL<sup>-1</sup>) e 10 (5,05 LogUFC.mL<sup>-1</sup>); e, menor para o Tratamento 6 (4,05 LogUFC.mL<sup>-1</sup>). Maiores crescimentos das bactérias probióticas nos pontos centrais (15% FrY e EPC) indicam meios balanceados nutricionalmente que favorecem o crescimento sinérgico de ambas as bactérias estudadas em um tempo adequado de fermentação. Menores crescimentos no Tratamento 6 (25% FrY e 15% EPC) mostram o efeito negativo do aumento no teor de FrY sobre o crescimento das bactérias, que por sua vez é rica em prebióticos como a inulina, de forma possivelmente a inibir o crescimento.

Quanto às respostas consumo de açúcares totais e redutores C<sub>AT</sub> (g/L) e C<sub>AR</sub> (g/L), ao avaliar o efeito das variáveis independentes do DCCR, nota-se maior C<sub>AT</sub> nos pontos centrais Tratamento 9 (34,3 g/L); 10 (34,3 g/L) e 11 (34,1 g/L) e menor C<sub>AT</sub> para o Tratamento 3 (18,4 g/L) seguido do Tratamento 6 (19,2 g/L).

Todos os resultados apresentados na Tabela 6 foram tratados estatisticamente, e assim foram obtidos os coeficientes da regressão e foi feita a análise de variância ANOVA a 95% de confiança (p<0,05). Para os modelos com bom ajuste (coeficiente de determinação R<sup>2</sup> > 0,70 e regressão significativa pelo teste F), foram geradas superfícies de respostas e curvas de contorno (Rodrigues e Iemma, 2014).

Tabela 6 - Resultados dos ensaios do Delineamento Composto Central Rotacional (DCCR)

Trat.	%FrY (x1)	%EPC (x2)	Tempo (h)	Respostas										
				CrsTotal (LogUFC.mL <sup>-1</sup> )	CrsLR (LogUFC.mL <sup>-1</sup> )	CrsBL (LogUFC.mL <sup>-1</sup> )	C <sub>AT</sub> (g/L)	C <sub>AR</sub> (g/L)	P <sub>EPS</sub> (g/L)	P <sub>AT</sub> (g/L)	L*	a*	b*	Turbidez Final
1	-1 (7,9)	-1 (4,36)	19,50	4,95	5,14	4,89	25,30	23,57	0,19	0,68	12,51	4,67	13,68	2,63
2	-1 (7,9)	1 (25,64)	20,00	4,97	4,81	5,00	23,87	24,18	0,18	0,81	4,53	6,04	7,19	2,84
3	1 (22,08)	-1 (4,36)	20,00	4,51	4,41	4,53	18,37	23,52	0,21	0,84	5,60	9,00	9,60	2,57
4	1 (22,08)	1 (25,64)	20,25	4,22	4,37	4,17	19,52	19,08	0,23	1,07	0,26	0,97	0,45	2,99
5	-1,41 (5)	0,0 (15)	20,40	4,89	5,33	4,64	20,42	18,24	0,00	0,57	11,34	6,42	14,42	2,97
6	1,41 (25)	0,0 (15)	20,40	4,13	4,31	4,05	19,16	17,81	0,08	1,08	0,91	2,60	1,55	2,99
7	0,0 (15)	-1,41 (0)	19,50	4,97	5,24	4,89	24,91	18,67	0,00	0,77	4,77	4,49	6,78	2,78
8	0,0 (15)	1,41 (30)	20,00	4,77	4,95	4,71	20,87	21,91	0,00	0,83	0,68	1,95	1,16	3,00
9(pc)	0,0 (15)	0,0 (15)	20,00	5,10	5,29	5,02	34,29	34,05	0,03	0,78	6,34	6,33	8,92	2,84
10(pc)	0,0 (15)	0,0 (15)	20,00	5,13	5,33	5,05	34,29	34,10	0,03	0,77	7,40	7,77	10,48	2,75
11(pc)	0,0 (15)	0,0 (15)	20,00	5,12	5,28	5,05	34,12	34,17	0,03	0,77	7,51	8,33	11,45	2,77

Legenda: Trats: Tratamentos; CrsTotal: Crescimento total; CrsLR: Crescimento de *Lactobacillus rhamnosus*; CrsBL: Crescimento de *Bifidobacterium longum*; C<sub>AT</sub>: Consumo de açúcares totais; C<sub>AR</sub>: Consumo de açúcares redutores; P<sub>EPS</sub>: Produção de exopolissacarídeos; P<sub>AT</sub>: Produção de ácidos totais; L\*: luminosidade; a\* var. vermelho e verde; b\* var. amarelo e azul; pc: ponto central.

Fonte: Do Autor, 2021.

Há também maior  $C_{AR}$  para os pontos centrais Tratamento 9 (34,1 g/L); 10 (34,1 g/L) e 11 (34,2 g/L) e menor  $C_{AR}$  para o Tratamento 6 (17,8 g/L). Tais resultados são corroborados com os resultados do crescimento total e diferenciado das bactérias probióticas nos pontos centrais e tratamento 6, já que a tendência é de maior consumo de substratos com maior crescimento celular.

A produção de EPS não se distanciou muito dos resultados encontrados no PB 12, pois todos os tratamentos também apresentaram resultados baixos de produção (máx. 0,23 g/L no tratamento 4) enquanto que alguns não apresentaram produção nenhuma (Tratamentos 5,7 e 8), podendo este resultado ser comparado aos obtidos por Li et al. (2014) que obteve até 0,63 g/L ao fermentar extrato de soja pela bactéria *Lactobacillus rhamnosus* e Savadogo et al. (2004) que obteve até 0,8g/L de EPS em caldo MRS fermentado por *Streptococcus thermophilus*. Considerando-se a complexidade envolvida no processo de produção de EPS e ainda as constatações de Mondragón-Bernal et al. (2017) de que não há correlação entre crescimento celular e produção de EPS, mas há correlação entre aumento da viscosidade do meio e produção de EPS. Verifica-se que os resultados aqui encontrados resultaram em produtos pouco viscosos, portanto, os produtos fermentados neste estudo assemelham-se mais a bebidas fermentadas tipo kombucha.

A  $P_{AT}$  (g/L) nos tratamentos do DCCR, variou entre 0,57 g/L (Tratamento 5) a 1,07 g/L (Tratamento 4) apresentando um valor médio de 0,8 g/L nos pontos centrais. Conforme mostra a Tabela 10, o teor de farinha de yacon exerceu efeito significativo e positivo na produção de ácidos totais, deixando, portanto, a bebida mais ácida.

Com respeito à cor, verificou-se que tanto o teor de farinha de yacon, como o teor de Extrato de polpa de café influenciaram de forma significativa e negativa os parâmetros de luminosidade ( $L^*$ ), como o parâmetro  $b^*$ , deixando a bebida mais escura, ao nível de 5% de significância (Tabela 10). Já para a parâmetro  $a^*$ , apenas o teor de extrato de polpa de café (EPC) exerceu efeito significativo e negativo. O maior valor para o parâmetro de cor  $L^*$  (luminosidade) foi o Tratamento 1 (12,51) indicando ser a cor do meio fermentado mais clara entre todos os tratamentos, sendo que a cor do Tratamento 4 foi a mais escura, com menor valor de  $L^*$  (0,41). Para o parâmetro  $a^*$  (Var. entre vermelho e verde) o Tratamento 11 apresentou maior valor (8,33) não se distanciando muito dos demais ensaios no ponto central, e o Tratamento 4 também apresentou menor valor (0,97).

Quanto ao parâmetro  $b^*$  (Var. entre amarelo e azul) o Tratamento 1 apresentou maior valor (13,68) e o Tratamento 4 menor valor (0,45). Logo o tratamento 4 apresentou-se como o

tratamento mais escuro e o tratamento 1 o mais claro. Por se tratar de uma bebida à base de café, a melhor cor será aquela que lembre mais a este. A avaliação sobre os parâmetros de cor pode auxiliar na determinação do melhor protótipo em termos dos parâmetros instrumentais para cor, para aqueles que se melhor enquadram com o tipo de bebida que remete a café com extratos vegetais, sendo assim buscou-se trabalhar na região do ótimo para favorecimento de tons marrom-claro nos passos finais de validação dos melhores protótipos.

Outro parâmetro físico utilizado para nortear a definição dos melhores protótipos foi a turbidez final que se apresentou com maior valor para o Tratamento 8 (3) e menor para o Tratamento 1 (2,63), mas de maneira geral pode-se notar não haver elevada variação entre os resultados de turbidez final de todos os tratamentos estudados no DCCR. Verificou-se que apenas o teor de extrato de polpa de café exerceu efeito significativo e positivos sobre a turbidez ( $p$ -valor  $< 0,05$ ). Quanto maior o teor de EPC maior será a turbidez da bebida fermentada. Estudos com análises sensoriais serão necessárias para determinar a aceitação por parte dos potenciais consumidores das preferências e aceitação quanto a sabor, viscosidade, turbidez e cor.

Os coeficientes de regressão e seus efeitos (destacados em negrito) são apresentados nas Tabela 7 e 8 para todas as respostas avaliadas. Os modelos que apresentaram bom ajuste aos dados experimentais foram Tempo ( $t$ ), Crescimento Total (CrescTotal); Crescimento de *Bifidobacterium longum* (CrescBL), Crescimento de *Lactobacillus rhamnosus* (CrescLR), Consumo de açúcares totais ( $C_{AT}$ ), Produção de ácidos totais ( $P_{AT}$ ) e Parâmetros de cor  $L^*$ ,  $a^*$ ,  $b^*$ . A Tabela 9, apresenta os resultados da análise de variância ANOVA a 95% de confiança ( $p < 0,005$ ) para os casos em que houve bons ajustes dos modelos.

A Figura 1 representa as superfícies de respostas para cada variável independente ajustada aos modelos quadráticos polinomiais (Equações 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 e 11).

Tabela 7 - Coeficientes de regressão,  $r^2$  e  $p$ -valor gerados a partir das análises sobre tempo; CrsTotal; CrsLR; CrsBL;  $C_{AT}$  e  $C_{AR}$

Parâmetros	Respostas											
	Tempo (h)		CrsTotal (LogUFC.mL <sup>-1</sup> )		CrsLR (LogUFC.mL <sup>-1</sup> )		CrsBL (LogUFC.mL <sup>-1</sup> )		$C_{AT}$ (g/L)		$C_{AR}$ (g/L)	
	Regr.	p-valor	Regr.	p-valor	Regr.	p-valor	Regr.	p-valor	Regr.	p-valor	Regr.	p-valor
Média/Inter.	<b>20</b>	<b>0,00</b>	<b>5,11</b>	<b>0,00</b>	<b>5,30</b>	<b>0,00</b>	<b>5,04</b>	<b>0,00</b>	<b>34,22</b>	<b>0,00</b>	<b>24,18</b>	<b>0,00</b>
X <sub>1</sub> (L)	0,09	0,13	<b>-0,28</b>	<b>0,00</b>	<b>-0,32</b>	<b>0,00</b>	<b>-0,25</b>	<b>0,00</b>	<b>-1,63</b>	<b>0,04</b>	0,07	0,25
X <sub>1</sub> (Q)	<b>0,16</b>	<b>0,04</b>	<b>-0,31</b>	<b>0,00</b>	<b>-0,30</b>	<b>0,00</b>	<b>-0,32</b>	<b>0,00</b>	<b>-7,11</b>	<b>0,00</b>	-0,03	0,61
X <sub>2</sub> (L)	<b>0,18</b>	<b>0,01</b>	<b>-0,06</b>	<b>0,00</b>	-0,09	0,17	-0,06	0,06	-0,74	0,28	0,07	0,25
X <sub>2</sub> (Q)	<b>-0,15</b>	<b>0,04</b>	<b>-0,13</b>	<b>0,00</b>	-0,17	0,06	<b>-0,10</b>	<b>0,02</b>	<b>-5,56</b>	<b>0,00</b>	-0,03	0,61
X <sub>1</sub> X <sub>2</sub>	-0,06	0,43	<b>-0,07</b>	<b>0,00</b>	0,07	0,44	<b>-0,11</b>	<b>0,02</b>	0,64	0,49	-0,15	0,12
R <sup>2</sup>	0,87		0,99	0,00	0,97		0,97		0,96		0,58	

Legenda: CrsTotal: Crescimento total; CrsLR: Crescimento de *Lactobacillus rhamnosus*; CrsBL: Crescimento de *Bifidobacterium longum*;  $C_{AT}$ : Consumo de açúcares totais;  $C_{AR}$ : Consumo de açúcares redutores. L: Termo Linear; Q (Termo Quadrático). R<sup>2</sup> coeficiente de determinação. Regr: Coeficientes de regressão.  
Fonte: Do Autor, 2021.

Tabela 8 - Coeficientes de regressão,  $r^2$  e  $p$ -valor gerados a partir das análises sobre  $P_{EPS}$ ;  $P_{AT}$ ; L\*, a\*, b\* e Turbidez Final

Parâmetros	Respostas											
	PEPS (g/L)		PAT (g/L)		L*		a*		b*		Turbidez Final	
	Regr.	p-valor	Regr.	p-valor	Regr.	p-valor	Regr.	p-valor	Regr.	p-valor	Regr.	p-valor
Média/Interação	0,02	0,72	<b>0,77</b>	<b>0,00</b>	<b>7,08</b>	<b>0,00</b>	<b>7,47</b>	<b>0,00</b>	<b>10,28</b>	<b>0,00</b>	<b>2,78</b>	<b>0,00</b>
X <sub>1</sub> (L)	0,02	0,61	<b>0,14</b>	<b>0,00</b>	<b>-3,24</b>	<b>0,00</b>	-0,76	0,17	<b>-3,62</b>	<b>0,00</b>	0,01	0,76
X <sub>1</sub> (Q)	0,05	0,33	0,03	0,26	-0,15	0,82	-1,15	0,10	-0,71	0,47	0,05	0,36
X <sub>2</sub> (L)	0,00	0,96	0,05	0,07	<b>-2,38</b>	<b>0,00</b>	<b>-1,28</b>	<b>0,04</b>	<b>-2,94</b>	<b>0,01</b>	<b>0,11</b>	<b>0,04</b>
X <sub>2</sub> (Q)	0,03	0,52	0,02	0,47	<b>-1,85</b>	<b>0,04</b>	<b>-1,80</b>	<b>0,02</b>	<b>-2,71</b>	<b>0,03</b>	0,00	0,91
X <sub>1</sub> X <sub>2</sub>	0,00	0,88	0,02	0,54	0,66	0,44	<b>-2,34</b>	<b>0,01</b>	-0,66	0,56	0,05	0,41
R <sup>2</sup>	0,24		0,89		0,92		0,86		0,90		0,63	

Legenda:  $P_{EPS}$ : Produção de exopolissacarídeos;  $P_{AT}$ : Produção de ácidos totais; L\*: luminosidade; a\* var. vermelho e verde; b\* var. amarelo e azul. L: Termo Linear; Q (Termo Quadrático). R<sup>2</sup> coeficiente de determinação. Regr: Coeficientes de regressão.  
Fonte: Do Autor, 2021.

Os resultados das Tabelas 7 e 8 indicam que quanto maior a concentração de FrY no meio a tendência é de maior, maior produção de ácidos tituláveis, porém, elevadas concentrações dessa matéria prima levam ao efeito inibidor do crescimento das bactérias com consequente diminuição no consumo de substratos do meio. Assim deve-se limitar a adição da farinha de



yacon no meio de fermentação para evitar que esses fenômenos inibitórios, sendo indicado um teor em torno de 7,5% m/m.

Os resultados indicam também que quanto maior a proporção do EPC no meio maior o tempo de fermentação; diminuição também no crescimento total, mostrando que um valor intermediário de EPC, em torno de 7,5% m/v seria indicado. Os efeitos sobre os parâmetros de cor e turbidez indicam haver maior escurecimento e turvação no meio na medida em que se adiciona ECP.

Observa-se pela Tabela 9 que os modelos de regressão para Tempo (h); CrescTotal (LogUFC.mL<sup>-1</sup>); CrescLR (LogUFC.mL<sup>-1</sup>); CrescBL (LogUFC.mL<sup>-1</sup>); C<sub>AT</sub> (g/L); P<sub>AT</sub> (g/L) e Parâmetros de cor L\*,a\*,b\* tiveram bons ajustes aos dados experimentais, pois foram significativos pelo Teste F (Fcalculado > Ftabelado, p-valor<0,05) e apresentaram bons coeficientes de determinação (R<sup>2</sup> > 0,7). Desta forma foram geradas curvas de contorno (Figura 6) e modelos preditivos para as respectivas respostas (Eqs: 3,4,5,6,7,8,9,10 e 11), em que, para os modelos, x1 é o valor codificado da % da FrY e x2 é o valor codificado da % de EPC.

Tabela 9 - Análise de variância ANOVA para as respostas Tempo; CrescTotal; CrescBL; CrescLR; C<sub>AT</sub>; P<sub>AT</sub> e Parâmetros de cor L\*, a\*, b\*

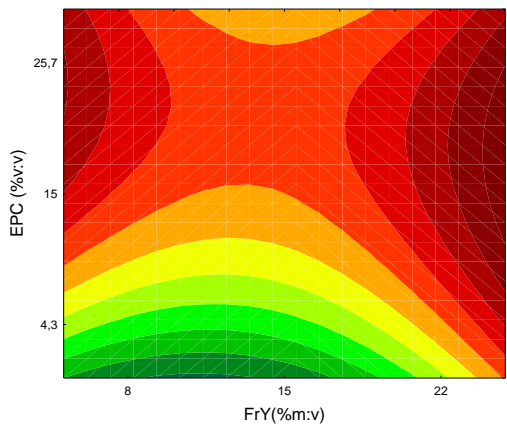
<b>Tempo (h)</b>						
Fonte de Variação	SQ	GL	QM	Fcalc	Ftab (5%)	p-valor
Regressão	0,77	5	0,15	7,14	5,05	0,02
Error	0,10	5	0,02			
Total	0,88	10				
R <sup>2</sup>	0,98					
<b>CrescTotal (LogUFC.mL<sup>-1</sup>)</b>						
Fonte de Variação	SQ	GL	QM	Fcalc	Ftab (5%)	p-valor
Regressão	1,25	5	0,25	322,21	5,05	2,88x10 <sup>-6</sup>
Error	0,00	5	0,00			
Total	1,26	10				
r <sup>2</sup>	0,99					
<b>CrescLR (LogUFC.mL<sup>-1</sup>)</b>						
Fonte de Variação	SQ	GL	QM	Fcalc	Ftab (5%)	p-valor
Regressão	1,52	5	0,30	9,65	5,05	0,01
Error	0,15	5	0,03			
Total	1,68	10				
r <sup>2</sup>	0,98					
<b>CrescBL (LogUFC.mL<sup>-1</sup>)</b>						
Fonte de Variação	SQ	GL	QM	Fcalc	Ftab (5%)	p-valor
Regressão	1,20	5	0,24	42,71	5,05	0,00

Error	0,02	5	0,00			
Total	1,23	10				
r <sup>2</sup>	0,97					
<b>CAT (g/L)</b>						
Fonte de Variação	SQ	GL	QM	Fcalc	Ftab (5%)	p-valor
Regressão	387,83	5	77,56	25,27	5,05	0,00
Error	15,34	5	3,06			
Total	403,18	10				
r <sup>2</sup>	0,96					
<b>PAT (g/L)</b>						
Fonte de Variação	SQ	GL	QM	Fcalc	Ftab (5%)	p-valor
Regressão	0,19	5	0,03	8,24	5,05	0,01
Error	0,02	5	0,00			
Total	0,22	10				
r <sup>2</sup>	0,89					
<b>Parâmetro L*</b>						
Fonte de Variação	SQ	GL	QM	Fcalc	Ftab (5%)	p-valor
Regressão	151,74	5	30,34	11,75	5,05	0,00
Error	12,90	5	2,58			
Total	164,65	10				
r <sup>2</sup>	0,92					
<b>Parâmetro a*</b>						
Fonte de Variação	SQ	GL	QM	Fcalc	Ftab (5%)	p-valor
Regressão	60,62	5	12,12	6,44	5,05	0,03
Error	9,41	5	1,88			
Total	10,03	10				
r <sup>2</sup>	0,86					
<b>Parâmetro b*</b>						
Fonte de Variação	SQ	GL	QM	Fcalc	Ftab (5%)	p-valor
Regressão	218,28	5	43,65	9,24	5,05	0,01
Error	23,61	5	4,72			
Total	241,90	10				
r <sup>2</sup>	0,90					

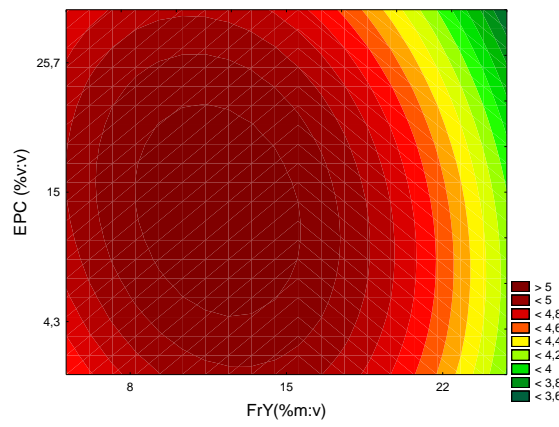
Legenda: SQ: Soma dos quadrados; GL: Graus de liberdade; QM Quadrado médio; Fcalc: F calculado; Ftab: F tabelado; r<sup>2</sup>: coeficiente de determinação explicado.

Fonte: Do Autor, 2021.

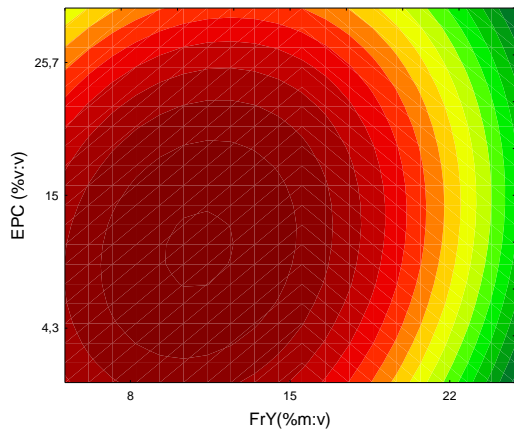
Figura 1. - Curvas de contorno para Tempo (a); CrescTotal (b); CrescLR (c); CrescBL (d);  $C_{AT}$  (e);  $P_{AT}$  (f);  $L^*$ (g);  $a^*$ (h) e  $b^*$ (i).



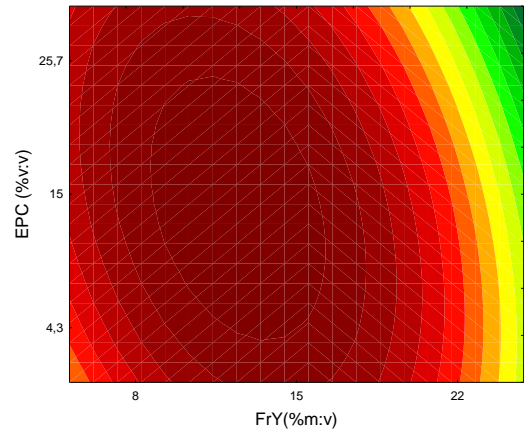
(a)



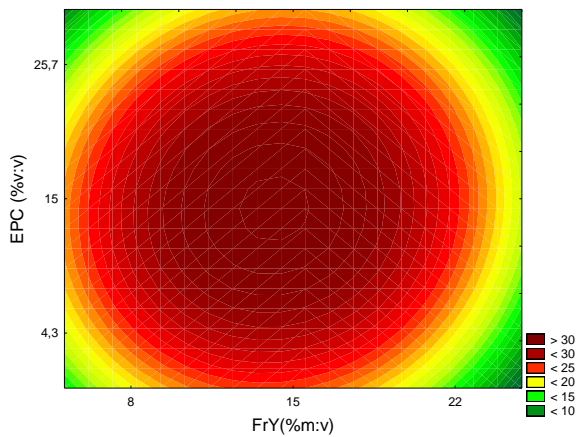
(b)



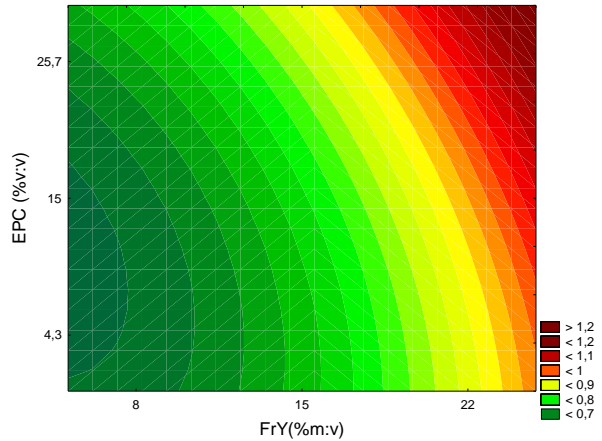
(c)



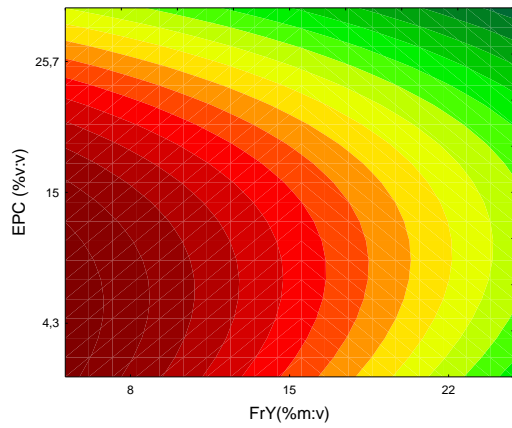
(d)



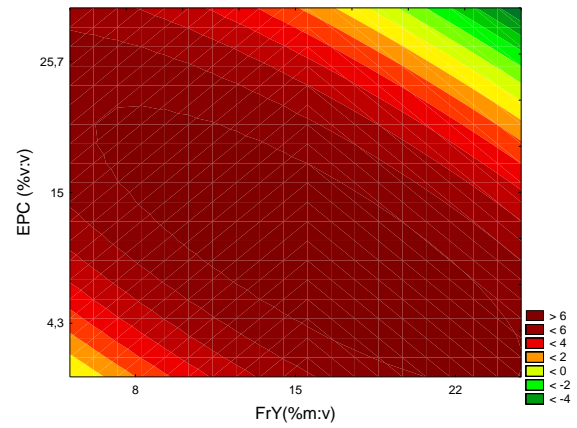
(e)



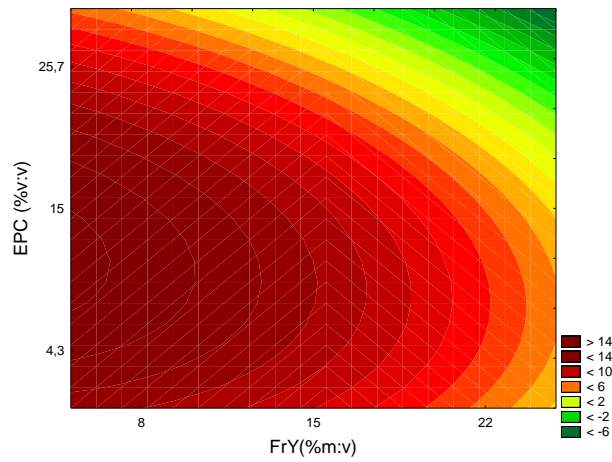
(f)



(g)



(h)



(i)

Fonte: Do Autor, 2021.

$$\text{Tempo} = 20 + 0,093 \cdot x_1 + 0,16 \cdot x_1^2 + 0,18 \cdot x_2 - 0,15 \cdot x_2^2 - 0,0625 \cdot x_1 \cdot x_2 \quad \text{Eq (3).}$$

$$\text{CrescTotal} = 5,30 - 0,32 \cdot x_1 - 0,30 \cdot x_1^2 - 0,098 \cdot x_2 - 0,17 \cdot x_2^2 + 0,073 \cdot x_1 \cdot x_2 \quad \text{Eq (4).}$$

$$\text{CrescLR} = 5,30 - 0,32 \cdot x_1 - 0,30 \cdot x_1^2 - 0,09 \cdot x_2 - 0,17 \cdot x_2^2 + 0,07375 \cdot x_1 \cdot x_2 \quad \text{Eq (5).}$$

$$\text{CrescBL} = 5,03 - 0,25 \cdot x_1 - 0,32 \cdot x_1^2 - 0,06 \cdot x_2 - 0,10 \cdot x_2^2 - 0,116 \cdot x_1 \cdot x_2 \quad \text{Eq (6).}$$

$$\text{C}_{AT} = 34,22 - 1,63 \cdot x_1 - 7,11 \cdot x_1^2 - 0,74 \cdot x_2 - 5,56 \cdot x_2^2 + 0,64 \cdot x_1 \cdot x_2 \quad \text{Eq (7).}$$

$$\text{P}_{AT} = 0,76 + 0,14 \cdot x_1 + 0,03 \cdot x_1^2 + 0,055 \cdot x_2 + 0,022 \cdot x_2^2 + 0,0225 \cdot x_1 \cdot x_2 \quad \text{Eq (8).}$$

$$\text{L}^* = 7,08 - 3,24 \cdot x_1 - 0,15 \cdot x_1^2 - 2,38 \cdot x_2 - 1,85 \cdot x_2^2 + 0,66 \cdot x_1 \cdot x_2 \quad \text{Eq (9).}$$

$$\text{a}^* = 7,47 - 0,767 \cdot x_1 - 1,15 \cdot x_1^2 - 1,28 \cdot x_2 - 1,80 \cdot x_2^2 - 2,34 \cdot x_1 \cdot x_2 \quad \text{Eq (10).}$$

$$\text{b}^* = 10,28 - 3,62 \cdot x_1 - 0,71 \cdot x_1^2 - 2,94 \cdot x_2 - 2,71 \cdot x_2^2 - 0,66 \cdot x_1 \cdot x_2 \quad \text{Eq (11).}$$

Avaliando-se a Figura 1(a) pode-se notar dentro dos limites desse estudo que a região ótima para fermentação em menores tempos (em torno de 20h) está nas faixas de concentração de 8-15% FrY e de 4,3% do EPC. A faixa ótima para obtenção dos maiores CrescTotal; CrescLR e CrescBL (entorno de 13 LogUFC.mL<sup>-1</sup>) está entre 8-15% de FrY e 5-23% de EPC como pode ser visto nas Figuras 1(b), 1(c) e 1(d). De acordo com a Figura 6(e), a faixa ótima para maior C<sub>AT</sub> (Aprox. 34 g/L) está entre 11-16% FrY e e 11-16% de EPC, bem próximo da faixa ótima de FrY e dentro da faixa ótima de EPC para crescimento das bactérias. Para maior P<sub>AT</sub> (Aprox. 1 g/L) a faixa ótima a se trabalhar é de 22-24% da FrY e 25,6-26% do EPC conforme Figura 1(f), o que não coincide com a o ótimo para crescimento celular e consumo de substratos, ou seja, para ótima produção de ácidos é requerido maiores concentrações de FrY e EPC que por suas vezes causam efeitos inibitórios do crescimento celular. E em se tratando dos parâmetros de cor, os valores intermediários para L\* (7), a\* (7,5) e b\* (10) foram considerados os melhores estando nas regiões ótimas de 13-19% de FrY e 21-25% do EPC para L\* (Figura 1(g)); entre 21- 25% de FrY e 21-27% de EPC (Figura 1(h)) para a\* e entre 15-25% da FrY e 17-27% do EPC para b\* (Figura 1(i)), pois nessas regiões verificou-se favorecimento da cor marrom-claro, oque remete ao café com leite.

Através dessa avaliação buscando-se determinar os melhores protótipos, considerou-se como mais relevante as regiões do ótimo para as respostas de tempo (menores tempos) e contagens de células (o suficiente para ser considerada bebida funcional) para determinação das duas formulações para validação dos modelos segundo análise do DCCR. De acordo com a legislação brasileira, para ser considerado alimento probiótico a contagem total de células no meio deve ser de no mínimo 9 LogUFC.mL<sup>-1</sup> por dose diária e ainda que para desempenharem efeito funcional ótimo no organismo as células devem se apresentar em concentração mínima 6 LogUFC.mL<sup>-1</sup> (ANVISA, 2002). Desta maneira considerando os resultados avaliados em cada tratamento do DCCR, nota-se que todos se enquadram em alimentos funcionais de acordo com a legislação uma vez que todos apresentaram contagem superior a 9 LogUFC mL<sup>-1</sup> com região ótima de 8-15% de FrY e 5-23% de EPC. Com relação ao tempo, buscando beneficiar o processo, o ideal é que seja o menor possível, todos os tratamentos para o DCCR apresentaram tempo de fermentação em torno de 20h com região ótima de 8-15% FrY e de 5% do EPC.

### 3.4. Validação dos Modelos

Para validação dos modelos foram elaborados dois tratamentos com teores de FrY (%m:v) e EPC (%v:v) estabelecidos dentro da região de ótimo das variáveis respostas que apresentaram bom ajuste do modelo como demonstra a Tabela 10.

A Tabela 11 apresenta os resultados obtidos da validação dos modelos, bem como os resultados dos valores preditos pelos modelos e desvios relativos. Através dessa tabela pode-se verificar baixos desvios relativos (<10%) para as respostas: Tempo (h); CrescTotal (LogUFC.mL<sup>-1</sup>); CrescLR (LogUFC.mL<sup>-1</sup>) e CrescBL (LogUFC.mL<sup>-1</sup>), obtendo-se modelos validados para esses casos. Para as respostas que apresentaram desvios relativos acima de 10%, não foi possível validar os modelos.

Desta maneira no experimento realizado, pode-se prever o tempo de fermentação (h) e crescimento das bactérias probióticas (LogUFC.mL<sup>-1</sup>) nos meios com essas formulações e proporções das bactérias, dois parâmetros importantíssimos de serem controlados para otimização do processo fermentativo em questão.

Tabela 10 - Formulações utilizadas para validação dos modelos

Tratamentos	FrY (%m:v)	EPC (%v:v)	EPC <sub>F</sub> (%v:v)	EAJ (%v:v)
1	10	8	5	17,5
2	14	16	5	17,5

Legenda: FrY: Farinha de Yacon; EPC: Extrato da polpa de café; EPC<sub>F</sub>: Extrato da polpa de café funcional; EAJ: Extrato das amêndoas de jerivá.

Fonte: Do Autor, 2021.

Tabela 11 - Validação dos modelos; valores experimentais e preditos e desvios relativos

<b>Resultados Experimentais</b>				
Trat.	Tempo (h)	CrescTotal (LogUFC.mL <sup>-1</sup> )	CrescLR (LogUFC.mL <sup>-1</sup> )	CrescBL (LogUFC.mL <sup>-1</sup> )
1	20,0	5,07	5,63	4,80
2	20,5	5,04	5,75	5,48
<b>Valores Preditos</b>				
Trats.	Tempo (h)	CrescTotal (LogUFC.mL <sup>-1</sup> )	CrescLR (LogUFC.mL <sup>-1</sup> )	CrescBL (LogUFC.mL <sup>-1</sup> )
1	19,8	5,11	5,40	4,99
2	20,0	5,14	5,32	5,06
<b>Desvios Relativos</b>				
Trat..	Tempo %	CrescTotal %	CrescLR %	CrescBL %
1	1,1	0,7	4,1	3,9
2	2,4	2,1	7,5	7,6

Legenda: Trats: Tratamentos; CrescTotal: Crescimento Total; CrescLR: Crescimento de *Lactobacillus rhamnosus*; CrescBL: Crescimento de *Bifidobacterium longum*; P<sub>AT</sub>: Produção de ácidos totais; L\*, a\* e b\*: Parâmetros de cor.

Fonte: Do Autor, 2021.

### 3.5. Análise da produção de ácidos orgânicos na bebida simbiótica

Após quantificação em triplicata dos ácidos láctico e acético de todos os tratamentos do DCCR nos tempos inicial (t<sub>0</sub>) e final (t<sub>f</sub>) de fermentação por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE), obteve-se os resultados médios de produção de ácidos (Prod.Ác.) descritos pela Tabela 12.

Tabela 12 - Produção de ácidos: láctico e acético no DCCR.

Trats	Prod. Ácido Láctico (g/L)	Prod. Ácido Acético (g/L)
<b>1</b>	2,89±0,11	0,10±0,02
<b>2</b>	5,05±0,0	0,26±0,02
<b>3</b>	3,87±0,0	-
<b>4</b>	5,44±0,3	-
<b>5</b>	3,47±0,05	-
<b>6</b>	4,95±0,4	-
<b>7</b>	3,68±0,3	0,10±0,00
<b>8</b>	4,6±0,14	-
<b>9</b>	4,03±0,08	-

Fonte: Do Autor, 2021.

Estudos comprovam que as bifidobactérias tendem a produzir maior concentração de ácido acético do que ácido láctico a partir do consumo da glicose como principal fonte energética, normalmente em proporções de 1,5:1 (moles de ácido acético: ácido láctico) (Fukuda,

et al., 2011). Neste estudo verificou-se o contrário, uma tendência na maior produção de ácido láctico sobre ácido acético após os tempos que cada tratamento levou para fermentar ( $\approx 20$ h) apesar de a bifidobactéria estar presente em maior proporção com relação a bactéria láctica, sendo que para alguns tratamentos sequer houve produção de ácido acético, um resultado benéfico em termos sensoriais já que o ácido acético tende a agregar *flavor* desagradável ao paladar quando consumido, ao contrário do ácido láctico (Mondragón-Bernal, 2004).

Através dos resultados das médias de produção, nota-se que o Tratamento 4 (5% EPC<sub>F</sub>; 17,5% EAJ; 22,08% FrY e 25,64% EPC) apresentou maior produção de ácido láctico (5,44 g/L) sem produção do ácido acético enquanto que o Tratamento 1 (5% EPC<sub>F</sub>; 17,5% EAJ; 7,9% FrY e 4,36% EPC) apresentou menor produção do ácido láctico (2,89 g/L) e traços do ácido acético (0,10 g/L), assim como pode ser visualizado nos cromatogramas de uma das repetições de tempo inicial e final destes tratamentos ilustrados pelas Figuras 2 (a e b) e 3 (a e b) a seguir. Os cromatogramas de todos os tratamentos neste estudo avaliados, estão reunidos no Apêndice B. A maior produção de ácidos encontrada no Tratamento 4 pode ser explicada pela maior concentração de FrY e vice-versa para o Tratamento 1, visto que essa variável exerceu efeito significativo positivo na produção de ácidos tituláveis como visualizado anteriormente na avaliação do DCCR. Uma vez estando a proporção de 75%BL/25%LR fixada para todos os tratamentos, pode-se dizer que houve prevalência na produção do ácido láctico pela bactéria láctica.

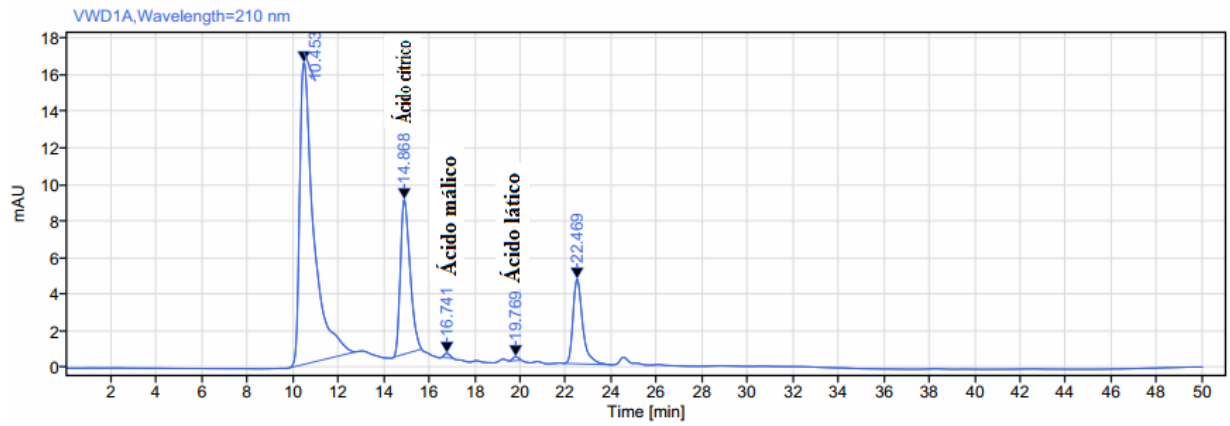
Cui et al., 2011, ao fermentar palha de milho com cultura mista de *Lactobacillus rhamnosus* e *Lactobacillus brevis*, notaram haver produção de entorno 17,7 g/L de ácido láctico como resultado da fermentação pela *Lactobacillus rhamnosus*. Wang, et al., 2010, detectou concentrações de até 174,5 g/L de ácido láctico utilizando 275 g/L de pó de mandioca com total de 222,5 g/L de açúcar através da fermentação do meio pela *Lactobacillus rhamnosus*, indicando o potencial dessa bactéria em fermentar meios vegetais alternativos. Hernández-Torres, 2019 encontrou até 7,4 g/L de ácido láctico produzido pela mistura de *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei*; *Lactobacillus rhamnosus*; *Lactobacillus acidophilus* e *Bifidobacterium longum* em meio formulado com 10% de farinha de yacon e 7% de farinha de amendoim.

De maneira geral, nas condições deste estudo, o ácido láctico tornou-se mais relevante devido a sua expressiva produção comparado ao ácido acético, especialmente pelas características benéficas que pode agregar ao sabor do produto acabado, apesar de não ter sido

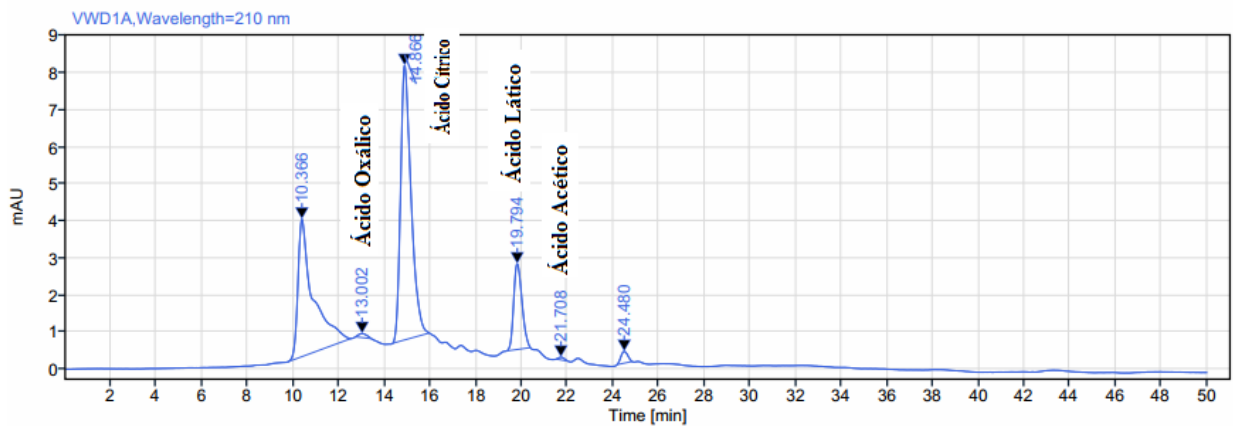


detectado em concentrações tão elevadas quanto as notadas em estudos que envolvem bases vegetais e bactérias do ácido lático.

Figura 2. - Cromatograma do tratamento 1, tempo inicial, repetição 1 (a); Cromatograma do tratamento 1, tempo final, repetição 1 (b).



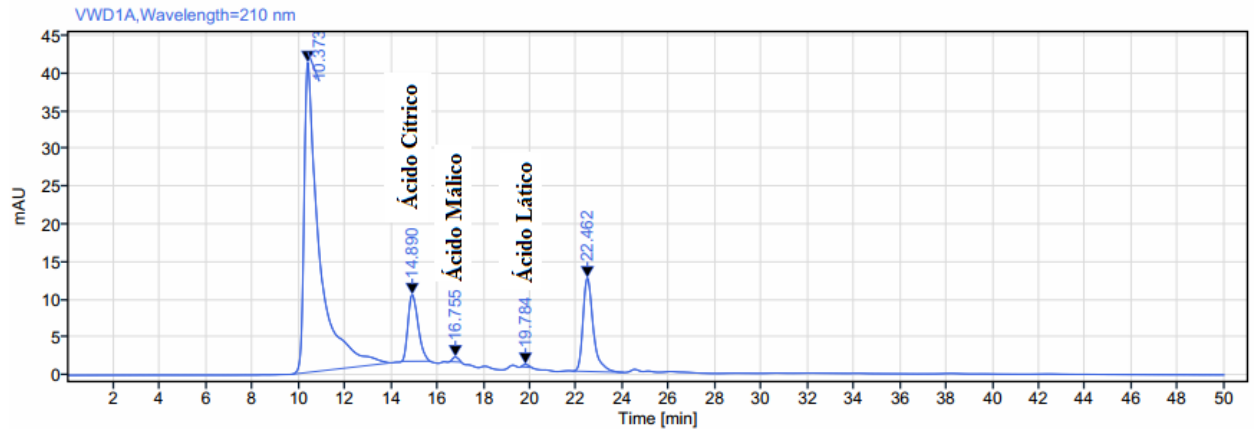
(a)



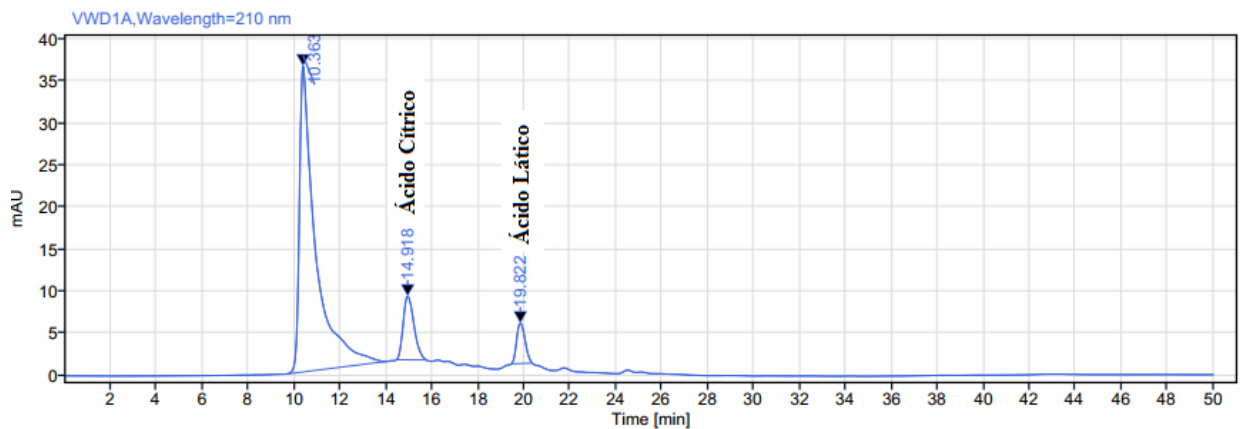
(b)

Fonte: Do Autor, 2021.

Figura 3. - Cromatograma do tratamento 4, tempo inicial, repetição 1 (a); Cromatograma do tratamento 4, tempo final, repetição 1(b).



(a)



(b)

Fonte: Do Autor, 2021.

### 3.6. Avaliação da proporção de bactérias vivas, mortas e injuriadas por Citometria de Fluxo

Através do uso do software de tratamento de dados FlowJo, determinou-se o melhor enquadramento da distribuição celular, de cada tratamento englobando a população alvo do estudo possibilitando a geração dos histogramas e seus respectivos quadrantes (Q1, Q2, Q3 e Q4), onde o eixo SSH-H corresponde à granulidade celular (Ajustado a 600V), FL2-H ao Iodeto de Propídio (injúria celular-Ajustado em 400V) e FL1-H ao CFDA (viabilidade celular-Ajustado em 600V).

Neste experimento não foram conduzidas avaliações sobre amostras em branco, desta forma as conclusões foram tomadas com base na análise de um padrão detectado sobre as células de se concentrarem próximas aos eixos pré-estabelecidos no histograma após sua

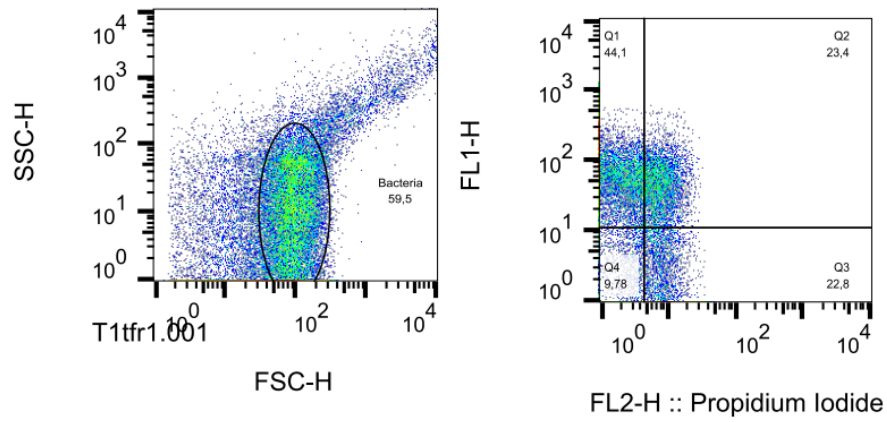
distribuição: Eixo Y= Canal FL1-H – Células marcadas por CFDA ou células vivas, portanto quadrante 1 (Q1) reúne maior concentração de células vivas com ativa atividade de esterase e membrana celular intacta. Eixo X= Canal FL2- H – Células marcadas por Iodeto de Propídio ou células mortas, portanto o quadrante 3 (Q3) reúne maior concentração de células mortas indicando que a membrana foi comprometida e que não existe atividade de esterase detectável; Região duplo negativa abaixo dos pontos  $X=0$  e  $Y=0$  pré-estabelecido na distribuição – Células sem marcação, portanto quadrante 4 (Q4) reúne células não marcadas por ambos os corantes e Região duplo positiva acima dos pontos  $X=0$  e  $Y=0$  pré-estabelecidos na distribuição – Células marcadas com ambos os corantes ou células injuriadas, portanto o quadrante 2 (Q2) reúne células marcadas por ambos os corantes indicando pequeno dano na membrana, porém ainda com atividade de esterases.

A seguir são apresentados os gráficos dos tratamentos com melhor distribuição das células e suas repetições com reprodutibilidade no  $t_f$  (Tratamentos 1,2,3,4,5 e 6), ou seja, aqueles em que houveram melhor distribuição celular percorrendo os 4 quadrantes de interesse, sendo, portanto, os tratamentos aqui avaliados quantitativamente na Tabela 13 e figura 4. A Tabela 14 representa a média da contagem total de bactérias em  $\text{LogUFC.mL}^{-1}$  para o tempo final de fermentação de todos os tratamentos do DCCR, também avaliados em Citometria.

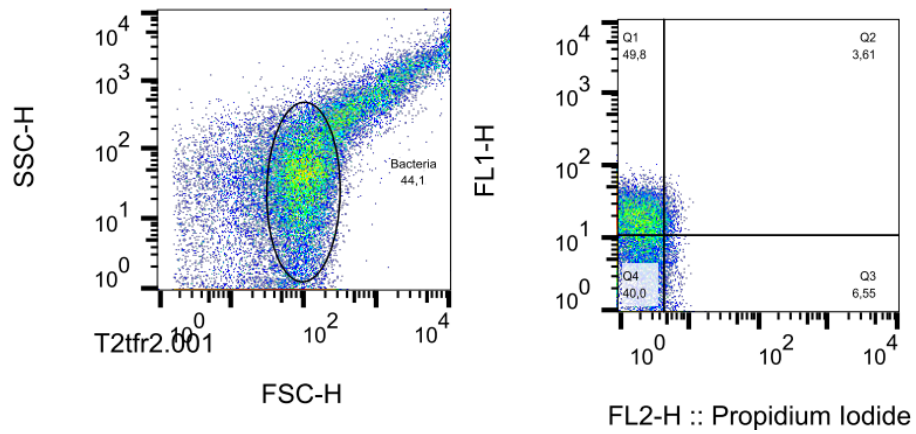
Aqueles tratamentos em que se observou, em todas as repetições nos  $t_0$  e  $t_f$ , tendência de retenção das distribuições celulares sobre ou antes a linha vertical Y do histograma com mais de 60% das células concentradas no quadrante duplo negativo (Q4 – sem marcação) (Tratamentos 7,8 e 9), são células não marcadas não apresentaram boa captura sendo inviabilizadas suas avaliações, seus resultados numéricos e histogramas são apresentados no Apêndice C.

Foi observado que os tratamentos que continham maior concentração da polpa de café apresentaram maiores porcentagens sem marcação, podendo este fator ter influenciado negativamente a análise de viabilidade das células, além de se considerar possíveis erros experimentais na dupla marcação, por sua vez altamente sensível. Wilkes et al., 2012 confirmam o desafio encontrado na aplicação da citometria de fluxo em análise de alimentos devido às partículas que interferem na análise. Bunthof e Abee (2002) encontraram dificuldades nas avaliações por citometria de fluxo ao estudarem a viabilidade de cultura probiótica pura e mista na fermentação de derivados lácteos como o queijo e o iogurte devido a interferência das partículas sólidas da matriz.

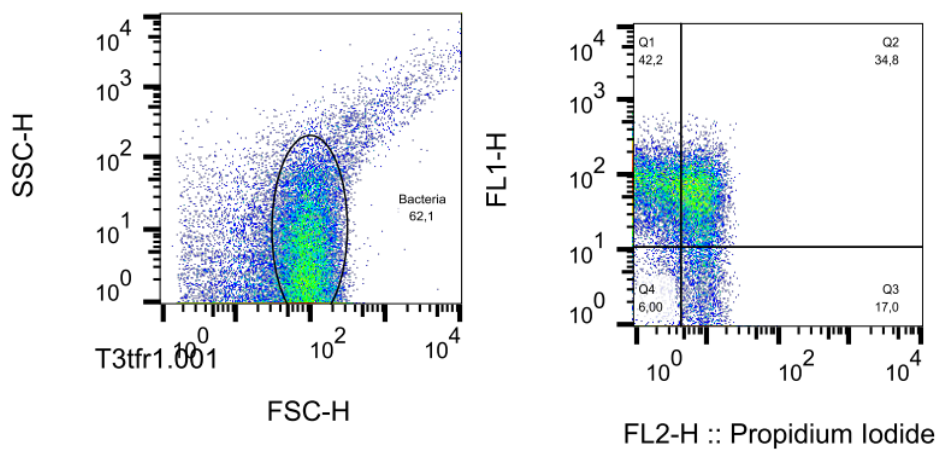
Figura 4. - Distribuição de células nos 4 quadrantes do histograma no tempo final de fermentação para Tratamento 1 (a); Tratamento 2 (b); Tratamento 3 (c); Tratamento 4 (d); Tratamento 5 (e) e Tratamento 6 (f).



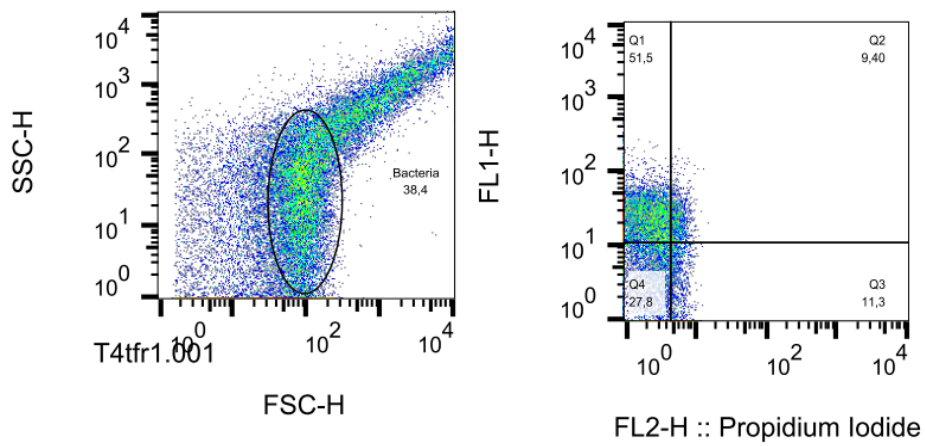
(a)



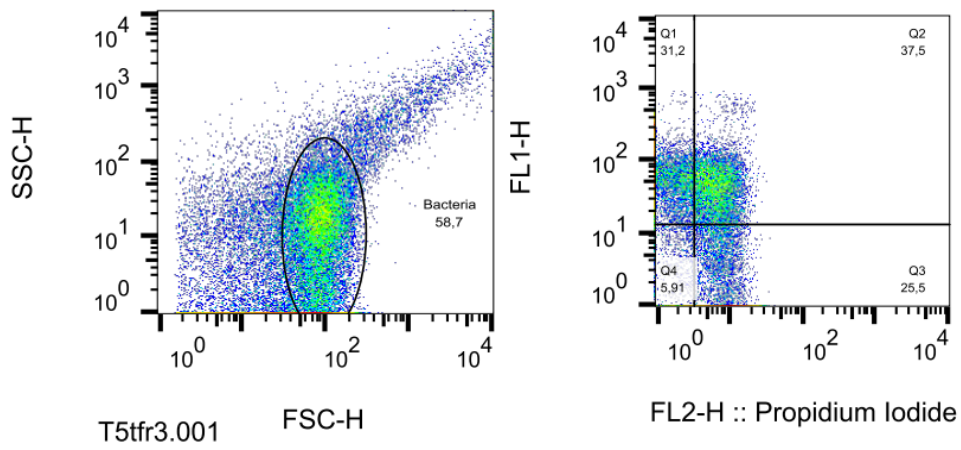
(b)



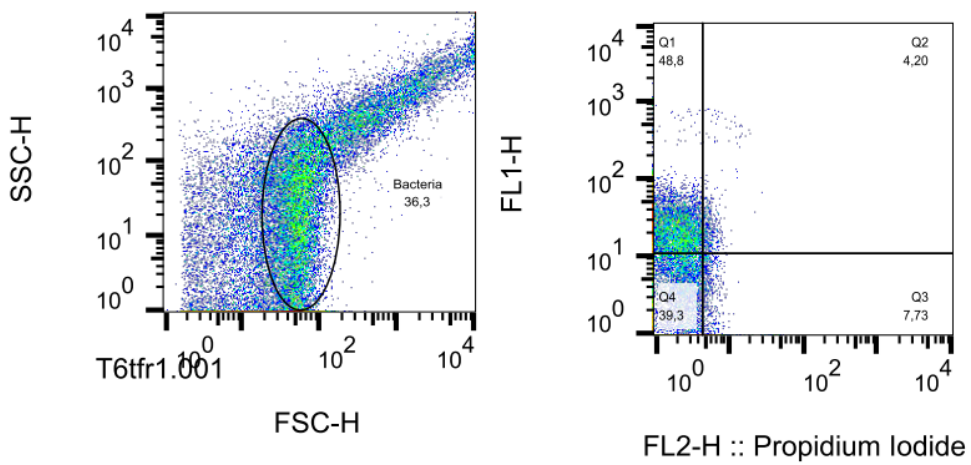
(c)



(d)



(e)



(f)

Fonte: Do Autor, 2021.

Tabela 13 - Média de porcentagem de distribuição do tempo final de fermentação (tf) para cada quadrante dos Tratamentos 1,2,3,4,5 e 6.

Tratamentos	Quadrante 1 (Q1) – (%) Vivas	Quadrante 2 (Q2) - (%) Injuriadas	Quadrante 3 (Q3) – (%) Mortas	Quadrante 4 (Q4) – (%) Sem Marcação
1	38,80±0,02 <sup>a</sup>	23,83±0,04 <sup>b</sup>	23,30±0,01 <sup>bc</sup>	14,12±0,07 <sup>a</sup>
2	45,76±0,04 <sup>a</sup>	3,00±0,02 <sup>a</sup>	5,69±0,06 <sup>a</sup>	45,50±0,1 <sup>b</sup>
3	38,85±0,07 <sup>a</sup>	33,50±0,01 <sup>c</sup>	19,75±0,08 <sup>b</sup>	7,91±0,01 <sup>a</sup>
4	48,45±0,09 <sup>a</sup>	7,30±0,04 <sup>a</sup>	10,42±0,04 <sup>a</sup>	33,85±0,07 <sup>b</sup>
5	34,35±0,04 <sup>a</sup>	32,55±0,2 <sup>c</sup>	26,15±0,14 <sup>c</sup>	7,00±0,38 <sup>a</sup>
6	46,70±0,08 <sup>a</sup>	2,87±0,06 <sup>a</sup>	5,83±0,04 <sup>a</sup>	43,60±0,03 <sup>b</sup>

\*As letras minúsculas na mesma coluna correspondem a análise estatística (Teste de Tukey). Letras diferentes correspondem a diferença significativa a nível de 5% de significância, letras iguais correspondem a igualdade significativa a nível de 5% de significância.

Fonte: Do Autor, 2021.

Tabela 14 - Média das contagens totais e de células não viáveis (LogUFC.mL<sup>-1</sup>) no tempo final de fermentação para os tratamentos possíveis de serem avaliados em Citometria de Fluxo.

Tratamentos	Contagem Total (tf) (LogUFC.mL <sup>-1</sup> )	Células não viáveis (tf) (LogUFC.mL <sup>-1</sup> )
1	13,46±0,007 <sup>e</sup>	3,13±0,007 <sup>e</sup>
2	13,46±0,003 <sup>e</sup>	0,76±0,003 <sup>e</sup>
3	12,99±0,03 <sup>c</sup>	2,56±0,03 <sup>c</sup>
4	12,73±0,03 <sup>b</sup>	1,32±0,03 <sup>b</sup>
5	13,4±0,002 <sup>d</sup>	3,50±0,002 <sup>d</sup>
6	12,58±0,01 <sup>a</sup>	0,73±0,01 <sup>a</sup>

\*As letras minúsculas na mesma coluna correspondem a análise estatística (Teste de Tukey). Letras diferentes correspondem a diferença significativa a nível de 5% de significância, letras iguais correspondem a igualdade significativa a nível de 5% de significância.

Fonte: Do Autor, 2021.

Em acordo com as RDC nº2 de 2002 da ANVISA, para ser considerado alimento probiótico as células devem permanecer viáveis no produto acabado em contagem de no mínimo 9 LogUFC.mL<sup>-1</sup>, desta forma neste experimento tanto as contagens padrão em placas quanto a avaliação da viabilidade de células por citometria de fluxo comprovam que a bebida simbiótica estudada apresenta potencial efeito funcional sobre o organismo humano. A

citometria de fluxo permite quantificar, além das células vivas detectadas por contagem padrão em placas, células mortas e injuriadas que compõem o meio.

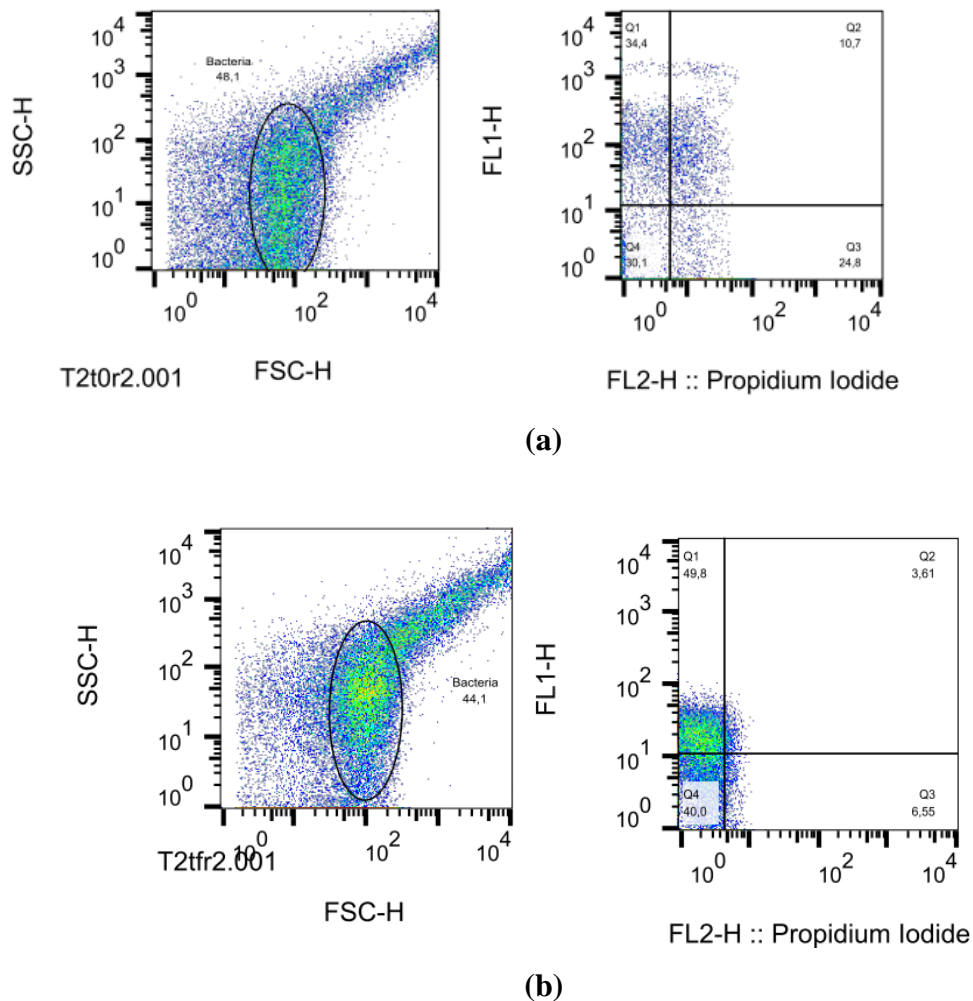
No contexto dos potenciais benefícios dos pós-bióticos à saúde, proporções elevadas de células injuriadas ou mortas (parabióticos) e seus compostos extra e intra-celulares (pós-bióticos) também são de grande relevância para aderir funcionalidade ao alimento, como ácidos graxos de cadeia curta, enzimas, peptídeos, ácidos teicóicos, muropeptídeos derivados de peptidoglicano, endo e exo-polissacarídeos, proteínas da superfície celular, vitaminas, plamogênios e ácidos orgânicos (Konstantinov et al., 2013; Oberg et al., 2011; Tsilingiri e Rescigno, 2013).

Evidências recentes sugerem que a viabilidade bacteriana não é exclusivamente necessária para atingir efeitos promotores da saúde, pois nem todos os mecanismos nem benefícios clínicos estão diretamente relacionados às bactérias vivas (Lee et al., 2002; Garcia, 2018). Os pós-bióticos apresentam potencial antioxidante, antimicrobiano, imunomodulatório, anti-inflamatório, hipocolesterolêmicos, anti-obesogênicos e anti-hipertensivos (Sharma e Shukla, 2016; Shenderov, 2013). Supõe-se que sejam mais estáveis do que as bactérias vivas das quais são derivados (Garcia, 2018).

Sendo assim pode-se concluir, considerando analogia sobre as contagens padrão junto às avaliações por citometria de fluxo nos tempos finais de fermentação, que os Tratamentos 1,2,3,4, 5 e 6 garantem a funcionalidade do produto graças às células probióticas vivas e compostos pós-bióticos presentes no meio, visto que nestes tratamentos verificou-se contagens totais de células viáveis em (tf) acima de  $9 \text{ LogUFC.mL}^{-1}$  ( $13,4 \text{ LogUCF.mL}^{-1}$ ; para Tratamentos 1,2 e 5;  $12,7 \text{ LogUCF.mL}^{-1}$  para o Tratamento 4;  $12,9 \text{ LogUCF.mL}^{-1}$  para Tratamento 3 e  $12,5 \text{ LogUCF.mL}^{-1}$  para Tratamento 6) maiores proporções de células vivas (38,8%; 45,76%; 38,85%; 48,45%; 34,35% e 44,7% respectivamente) e proporções consideráveis de células injuriadas (23,83%; 3%; 33,5%; 7,295%; 32,55% e 2,87 respectivamente).

Ainda acerca das possíveis conclusões sobre a avaliação quantitativa da concentração de células vivas e mortas por citometria de fluxo, pode-se considerar que dos tratamentos mencionados no parágrafo anterior o Tratamento 2 favoreceu o aumento de células vivas após fermentação passando de 38,56% (t0) para 45,76% (tf) e a diminuição considerável da concentração de células mortas passando de 24,43% (t0) para 5,69% (tf), como representado pela Figura 5 a e b a seguir.

Figura 5. - Distribuição de células nos 4 quadrantes do histograma para as três repetições do tempo inicial do Tratamento 2 (a) e do tempo final do Tratamento 2 (b).



Fonte: Do Autor, 2021.

Raimond e Champagne (2015) ao compararem o método tradicional de contagem total de células com a avaliação de células vivas e mortas por citometria de fluxo através da avaliação de populações de *Lactobacillus rhamnosus* R0011 em suspensões celulares, obtiveram contagem total de 9,9 LogUFC.mL<sup>-1</sup> e em contrapartida 10,04 LogUFC.mL<sup>-1</sup> de células vivas e 7,92 LogUFC.mL<sup>-1</sup> de células mortas após avaliação por citometria de fluxo, concluindo que nessas suspensões de células puras, a metodologia de citometria de fluxo é mais precisa do que o método tradicional de plaqueamento e enumeração microscópica, sendo que as culturas lácticas são particularmente propensas à variabilidade em contagens padrão em placas devido às particularidades de suas cadeias celulares (Goel e Marth, 1969), deve-se ainda considerar a variabilidade no método de contagem em placas amplamente documentado em literatura (Corry et al., 2007).



Geng et al. (2014), avaliando a viabilidade de *Bifidobacterium lactis* em quatro diferentes produtos lácteos comparando com a contagem padrão em placas, verificaram boa correlação entre os dados com um valor de coeficiente de correlação de 0,945. O método de avaliação por citometria de fluxo permitiu a quantificação rápida desta bactéria, compreendendo um tempo de análise de 2h ao invés de 72h como o método de plaqueamento padrão exige. E ainda os autores comprovaram que o método de análise por citometria de fluxo permitiu analisar especificidades da espécie.

Song Chen, et al. (2012), ao aplicarem citometria de fluxo combinada com dupla coloração por CFDA/PI para avaliar os efeitos protetores da sacarose em seis cepas probióticas submetidas a passagem pelo trato gastrointestinal *in vitro*, verificaram maior concentração (23%) de células intactas do histograma para análise de *Lactobacillus rhamnosus*, e ainda notaram que a sacarose exerce efeito protetor sobre as células, sendo que nessa condição mais de um décimo das bactérias avaliadas se mantiveram intactas.

### **3.7. Resultados das Avaliações Funcionais**

#### **3.7.1. Teste de Digestibilidade *in vitro***

Os testes de digestibilidade *in vitro* foram conduzidos sobre as amostras de tempo final de fermentação dos dois tratamentos avaliados nas validações dos modelos do DCCR, sendo Tratamento 1 formulado em proporções de 10% FrY; 8% EPC; 5% EPC<sub>F</sub> e 17,5% EAJ e Tratamento 2 formulado em proporções de 14% FrY; 16% EPC; 5% EPC<sub>F</sub> e 17,5% EAJ.

Foram realizadas contagens totais (CT) (LogUFC.mL<sup>-1</sup>), em triplicata, sobre os dois tratamentos de forma a avaliar o efeito do trato gastrointestinal simulado sobre as bactérias *Lactobacillus rhamnosus* (LR) e *Bifidobacterium longum* (BL) na proporção em que foram inoculadas nos meios de fermentação em estudo (5x10<sup>8</sup> UFC.mL<sup>-1</sup> contendo 25% de LR e 75% de BL) buscando identificar a capacidade de sobrevivência desse inóculo após transito completo pelo trato gastrointestinal, sendo as avaliações ocorridas após 30 min de contato com a saliva (pH=6); 1h e 3h após contato com o suco gástrico (pH=1,2) e 4h e 8h após contato com o suco intestinal e suco pancreáticos previamente elaborados (Metodologias adaptadas de Bernucci, 2017; Mondragón-Bernal, 2009 e Hernández-Torres, 2019).

A Tabela 15 demonstra os resultados das contagens totais obtidas nessas condições de avaliação, nela pode-se notar que houve perdas variando de 7,6% a 60% no Tratamento 1 e de 8,95% a 39,2% no Tratamento 2 após transito completo pelo trato gastrointestinal simulado, e

desta forma vê-se que nas condições que se se deu o Tratamento 1 e 2 apresentaram resultados semelhantes visto que ambos apresentaram redução de até 60% com relação a suas contagens totais iniciais mantendo-se em torno de 5,26 LogUFC.mL<sup>-1</sup> e 5,21 LogUFC.mL<sup>-1</sup> ao final de modo que a redução no Tratamento 1 se deu de forma menos intensa até as 4h de simulação. A drástica redução na concentração de células vivas no meio, pode ser associada a falta do efeito protetor que o meio formulado poderia vir a exercer sobre as bactérias.

Tabela 15 - Resultados das CT (LogUFC.mL<sup>-1</sup>) das bactérias presentes nos dois tratamentos estudados durante as 8 horas de digestão do trato gastrointestinal *in vitro*

Digestão	Tempo (h)	Tratamento 1		Tratamento 2	
		CT (LogUFC.mL <sup>-1</sup> )*	%Perda	CT (LogUFC.mL <sup>-1</sup> )*	%Perda
<b>Sem Digerir (Tf das Fermentações)</b>		13,2 ± 0,3		13,29 ± 0,41	
<b>Saliva pH=6</b>	0,5	12,1 ± 0,1	7,6	12,10 ± 0,14	9,0
<b>Suco Gástrico pH= 1,2</b>	1	8,32±0,02	36,7	8,44 ± 0,02	36,4
<b>Suco Gástrico pH= 1,2</b>	3	8,1 ± 0,1	38,6	8,110 ± 0,001	39,0
<b>Suco Int.+Suco Panc. pH=4</b>	4	5,59±0,07	42,5	5,51 ± 0,05	58,5
<b>Suco Int.+Suco Panc. pH=8</b>	8	5,26±0,04	60,0	5,21±0,19	60,8

Legenda: \*CT= Contagens Totais, os resultados são médias das análises em triplicata. As % Perda foram definidas com relação às contagens totais verificadas ao tempo final de fermentação sem digestão.

Fonte: Do Autor, 2021.

De modo geral em ambos os tratamentos pode-se notar certa estabilidade nas contagens na primeira hora de avaliação e maior sensibilidade/perdas após 4h e 8h de digestão devido a interações com os sais biliares e enzimas presentes nos sucos intestinais e pancreáticos, e considerando as contagens finais verifica-se que ocorre manutenção de cerca de 5 LogUFC.mL<sup>-1</sup> de células vivas presentes no meio, para apresentar efeito terapêutico ótimo, as células devem apresentar concentrações mínimas de 7 LogUFC.mL<sup>-1</sup> (ANVISA, 2002). Deve-se ainda considerar a presença dos compostos pós-probióticos intra e extracelulares presentes no meio devido a degradação das células injuriadas presentes em proporções consideráveis como verificado no tópico de avaliação por citometria de fluxo.

As condições ácidas são um poderoso estresse ambiental ao qual as bactérias do ácido láctico são submetidas no trato gastrointestinal (De Angelis e Gobbetti, 2004; Karimi Torshizi et al., 2008; Kumar et al., 2011; Ljungh, 2006; Mattila-Sandholm, 2002; Olejnik et al., 2005;

Schar-Zammaretti et al., 2005). Foi relatado que a presença de sais biliares no ambiente de culturas de bactérias é mais prejudicial do que o efeito do pH (Angelis e Gobbetti, 2004; Karimi Torshizi et al., 2008; Olejnik et al., 2005), sendo que Shakirova et al., 2013 em seus estudos confirma essa afirmação ao detectar perda de até 57,6% das bactérias probióticas *Lactobacillus acidophilus* (LA5) e *Bifidobacterium lactis* (Bb12) na interação com sais biliares.

Hernandez-Torres (2019) encontrou taxas de sobrevivência variando de 53 a 54% da mistura dos probióticos LR:LBC:LA:BL em proporções de 8:22:2:68 respectivamente, ao submeter tratamentos formulados com farinha de yacon e farinha de amendoim, nas mesmas condições de simulação do trato gastrointestinal aqui estudadas. Mondragón-Bernal, 2009 obteve taxas de sobrevivência entre 37,9% a 68,3% da mistura de probióticos LR+LBC+LA+BL submetidos a fermentação de extrato de soja.

Como um todo, pode-se analisar que os probióticos sobreviveram ao pH extremo do estômago simulado, no entanto, os extratos utilizados neste estudo não protegem suficientemente as células contra a ação das enzimas e sais biliares presentes nos sucos pancreático e intestinal, sendo interessante para futuras pesquisas, estudar a encapsulação das células para melhorar a sua resistência aos sucos digestivos humanos.

### **3.7.2. Teste de Hidrofobicidade**

O teste de Hidrofobicidade se resume a medida da capacidade de bactérias como lactobacilos e bifidobactérias em se aderir ao Tecido Linfóide Associado ao Intestino (GALT) e logo de desempenharem sua atividade metabólica sendo ainda que ácidos graxos de cadeia curta, biocinas, vitaminas, enzimas, entre outros, estão entre alguns compostos metabólicos dessas bactérias, os chamados pós probióticos (Beachey, 1981). Ter essa capacidade de adesão pode aumentar as chances de sobrevivência ao trato gastrointestinal das bactérias probióticas (Okochi, et al., 2017), e assim exercer seus benefícios para a saúde como ação no sistema nervoso central; redução da pressão arterial; normalização do colesterol; influência sobre o metabolismo da lactose e digestão de alimentos; efeito sobre respostas imunológicas e proteção contra infecções parasitárias; atividade anti-inflamatória e fonte de vitamina B (George et al., 2018). Quanto maior a hidrofobicidade, maior a capacidade das células em se aderir ao epitélio intestinal.

Nas Tabela 16 estão representadas as % de Hidrofobicidade (%H) das linhagens puras de *Bifidobacterium longum* (BL), *Lactobacillus rhamnosus* (LR); Inóculo contendo 25% LR e

75% BL utilizado para as fermentações e amostras do tempo final de fermentação dos Tratamentos 1 e 2 dos experimentos de validação dos modelos do DCCR.

Tabela 16 - Resultados das Médias de %Hidrofobicidade das linhagens puras, inóculo e tratamentos da validação dos modelos no tempo final de fermentação

Tratamentos	%H (Médias)
Linhagem Pura BL	13,81±0,01
Linhagem Pura LR	34,31±0,02
Inóculo (25%LR+75%BL)	25,5±0,02
T1tf	32,07±3,53
T2tf	39,31±1,68

Fonte: Do Autor, 2021.

Segundo protocolo descrito por Felten et al. (1999), a hidrofobicidade é uma medida indireta da capacidade funcional dos probióticos de adesão ao tecido linfóide associado ao intestino (GALT), quanto mais hidrofóbico maior será a adesão. A hidrofobicidade pode ser classificada como alta (71-100%H), média (36-70%H) e baixa (0-35%H). De modo geral as linhagens estudadas puras ou em mistura apresentaram baixa aderência. Comparando as linhagens puras com o inóculo formulado pode-se verificar que a LR apresentou maior capacidade de aderência (34,43%H) comparada a BL (13,81%H) e Inóculo (25,5%H). Estudos de Barbosa et al. (2005) e Hernández-Torres (2019) comprovam que a BL realmente apresenta menor capacidade de adesão ao GALT com até 18%H.

Considerando os tratamentos de fermentação avaliados pode-se notar que o Tratamento 2 formulado por 16% EPC; 14% FrY; 5% EPC<sub>F</sub> e 17,5% EAJ, apresentou maior capacidade de aderência (39,31%H) comparado ao Tratamento 1 (32,07%), sendo o único tratamento que se enquadrou em hidrofobicidade média, provavelmente devido às interações químicas e microbiológicas do meio e do inóculo utilizado para este tratamento que continha mais EPC e FrY, favorecendo uma maior %H. Hernández-Torres (2019) verificou capacidade de aderência da cultura mista de probióticos que avaliou (LR:LBC:LA:BL em proporções de 8:22:2:68 respectivamente), de até 60,8% em meio formulado com 7% de Farinha e Yacon e 7% de Farinha de Amendoim.

Os fatores de aderência estão diretamente relacionados às cargas superficiais da estrutura celular, sendo que a presença de glico-proteínas na superfície celular faz com que as cargas negativas (que causam maior repulsão do que coesão das células ao epitélio) diminuam aumentando a hidrofobicidade e em contrapartida a presença de polissacarídeos pode aumentar a relação de cargas negativas diminuindo a hidrofobicidade (Kos, et al., 2003; Schar-

Zammaretti e Ubbik, 2003; Schar-Zammaretti et al., 2005). Pode-se associar esses fatos aos resultados aqui observados já que as condições de favorecimento de maior concentração de cargas negativas é uma característica das bifidobactérias, utilizadas em maiores proporções como inóculo para as fermentações.

Estudo de Krausova et al., 2019, ao avaliar a capacidade de aderência de 20 diferentes cepas isoladas de lactobacilos e bifidobactérias de origem humana e animal, notaram variações nos valores de hidrofobicidade de 6,1%H a 87,4%.

Shakirova et al., 2013, ao avaliar a %H ao submeter bifidobactérias e lactobacilos ao aumento da concentração de fontes e carboidratos e presença ou ausência de oxigênio durante as fermentações, notou aumentos lineares de %H em até 75,13%H ao aumentar a concentração de fontes de carboidrato na presença de oxigenio e de até 79,37%H ao aumentar a concentração de fontes de carboidrato na ausência de oxigenio. Estes autores afirmam ainda que as estimativas de hidrofobicidade são parâmetros importantes para prever a capacidade das bactérias probióticas intactas de suportar ambientes extremos como o trato gastrointestinal humano e, portanto, devem ser monitorados durante o cultivo.

#### 4. CONCLUSÃO

Conclui-se que foi possível elaborar uma bebida fermentada simbiótica contendo extratos vegetais de polpa de café, jerivá e yacon com as bactérias *Lactobacillus rhamnosus* e *Bifidobacterium longum* em tempo de fermentação razoável ( $\approx 20$ h) e com contagens de células suficientes para ser considerada funcional ( $>9$  LogUFC.mL<sup>-1</sup>). Os melhores protótipos de bebida simbiótica continham de 10 a 14 % m/v de Farinha de Yacon, 8 a 16 %v/v de extrato de polpa de café, 5% v/v de extrato de polpa de café funcional e 17,5% v/v de extrato de amêndoas de jerivá.

A bebida apresentou maiores proporções de ácido lático favorecendo seu *flavor* (máx. =5,44 g/L); consideráveis concentrações de células vivas (máx=48,45%) e presença de pós-bióticos (máx=23,3%) identificados pela Citometria de Fluxo que agregam efeitos benéficos à saúde do consumidor.

Das avaliações funcionais *in vitro*, conclui-se que apesar de o produto acabado apresentar elevadas concentrações de bactérias viáveis (máx.= 13 LogUFC.mL<sup>-1</sup>) e sobreviver ao pH extremo do estômago, não resistiram fortemente a ação das enzimas e sais biliares presentes nos sucos pancreático e intestinal (Contagens Finais  $\approx 5$  LogUFC.mL<sup>-1</sup>) sendo esse fato

associado à não proteção das células pelos extratos utilizados, e portanto sugere-se em futuros estudos, avaliar a possibilidade de microencapsular as células para garantir proteção e resistência no trânsito intestinal. Foi ainda detectado capacidade de aderência média (%H=39,31) dessas células ao colonizar o tecido intestinal devido às relações de cargas eletrostáticas da *Bifidobacterium longum*, presente em maiores proporções neste estudo.

## 5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADEBAYO-TAYO, B.; ISHOLA, R. & OYEWUNMI, T. Characterization, antioxidant and immunomodulatory potential on exopolysaccharide produced by wild type and mutant *Weissella confusa* strains. **Biotechnology Reports**, v. 19, 2018.

ANVISA– Agência Nacional de Vigilância Sanitária. “Regulamento técnico de substâncias bioativas e probióticos isolados com alegação de propriedades funcional e/ou de saúde” Resolução nº 2 de 7 de janeiro de 2002.

AOAC - Official Methods of Analysis. 18 th Edition, Association of Official Analytical chemists. Gaithersburg, 2012.

Aristizábal-Marulanda, V.; Chacón-Perez, Y.; Alzate, C.A.C. The biorefinery concept for the industrial valorization of coffee processing by-products. In Handbook of Coffee Processing By-Products: Sustainable Applications; **Elsevier Inc.**: Amsterdam, The Netherlands, 2017; pp. 63–92.

ASTAÑEDA, G. Enzymatic extraction of hydroxycinnamic acids from coffee pulp. **Food Technol. Biotechnol.** Vol. 49, nº 3, p. 369–373, 2011.

BEACHEY, E.H. Bacterial Adherence: Adhesin- Receptor interactions mediating the attachment of bacteria to mucosal surfaces. **The Journal of Infectious Diseases**, vol. 143, nº3, p. 325-345, 1981.

BARBOSA, F.; HENRIQUE, F.; MARÇAL, A. MARTINS, F.; NICOLI, J. Perfil de hidrofobicidade da superfície de *Bifidobacterium lactis* Bb12 e *Bifidobacterium longum* Bb46 em função do meio de cultura. **Revista de Biologia e Ciências da Terra**, vol. 5, nº 2, p.0, 2005.

BERNUCHI, B.S.P.; LOURES, C.M.G.; LOPES, S.C.A.; OLIVEIRA, M.C.; SABINO, A.P.; VILELA, J.M.C.; ANDRADE, M.S.; LACERDA, I.C.; NICOLE, J.R.; OLIVEIRA, E.S. Effect of microencapsulation conditions on the viability and functionality of *Bifidobacterium longum* 51A. **Food Science and Technology**, v. 80, p.41-347, 2017.

BERTOLO, A.P. Batata yacon: caracterização e inativação enzimática. **Revista CSBEA**, vol. 3, nº 1, 2017.

BUNTHOF, C. & ABEE, T. Desenvolvimento de um método de citometria de fluxo para análise de subpopulações de bactérias em produtos probióticos e fermentos lácteos. **Applied and Environmental Microbiology**, vol. 68, pp. 2934 – 2942, 2002.

COIMBRA, M.C. & JORGE, N. Proximate composition of guariroba (*Syagrus oleracea*), jerivá (*Syagrus romanzoffiana*) and macaúba (*Acrocomia aculeata*) palm fruits. **Food Research International**, v. 44, p. 2139-2142, 2011.

Corry, J.E.L.; Jarvis, B.; Passmore, S.; Hedges, A. Uma revisão crítica da incerteza de medição na enumeração de microrganismos alimentares. **Food Microbiol.**, vol. 24, págs. 230 – 253, 2007.

CUI, F. & WAN, C. Lactic acid production from corn stover using mixed cultures of *Lactobacillus rhamnosus* and *Lactobacillus brevis*. **Bioresource Technology**, v. 201, nº2, p. 1831-1836, 2011.

DE ANGELIS, M. & GOBBETTI, M. Respostas ao estresse ambiental em lactobacilos: uma resivão. **Proteômica**, vol, 4, p. 106-122, 2004.

FELTEN, A.; CLAUDE, B.; CHANTAL, B.; PHILIPPE, H.L.; PHILIPPON, A. Lactobacilus species identification, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> production, and antibiotic resistance and correlation with human clinical status. **Journal of Clinical Microbiology**, vol. 37, nº3, 1999.

Fukuda, S.; Toh, H.; Hase, K.; Oshima, K.; Nakanishi, Y.; Yoshimura, K.; Apostar.; Clarke, JM; Topping, DL; Suzuki, T. As bifidobactérias podem proteger da infecção enteropatogênica por meio da produção de acetato. **Nature**, v. 469, p. 543-547, 2011.

GARCIA, H.S. Postbiotics: An evolving term within the functional foods field. **Trends in Food Science & Technology**, v. 75, n. March, p. 105–114, 2018.

GENG, J; CHIRON, C.; COMBRISSE, J. Rapid and specific enumeration of viable Bifidobacteria in dairy products based on flow cytometry technology: A proof of concept study. **International Dairy Journal**, v. 37, nº 1, p. 1-4, 2014.

GEORGE, K.; R. et al. Benefaction of probiotics for human health: A review. **Journal of Food and Drug Analysis**, v. 26, n. 3, p. 927–939, 2018.

GOEL, M.C. & MARTH, E.H. Comprimento da cadeia de *Leuconostoc citrovorum* modificado por procedimentos de diluição e agitação da contagem de placas. **J. Dairy Sci.**, v. 52, pp. 1941 – 1947, 1969.

GRATTEPANCHE, F.; AUDET, P.; LACROIX, C.; Milk fermentation by functional mixed culture producing nisin Z and exopolysaccharides in a fresh cheese model. **International Dairy Journal**, vol. 17, nº 2, pág. 123-232, 2007.

GURRAM, R.; SAMUEL, M. A. & TAPAS, K. Technical possibilities of bioethanol production from coffee pulp: a renewable feedstock. **Clean Technologies and Environmental Policy**, v. 18, n. 1, p. 269–278, 2016.

HERNÁNDEZ-TORRES, D.L.H. Cinética, formulação e funcionalidade de fermentados de farinha de yacon (*S. sonchifolius*) e amendoim (*Arachis hypogae L.*) por quatro linhagens

**probióticas.** 80 p. 2019. *Dissertação (Mestrado em Ciências dos Alimentos)* – Universidade Federal de Lavras.

JHAM, G.N.; FERNANDES, S.A.; GARCIA, C.F.; SILVA, A.A. Comparison of GC and HPLC for the quantification of organic acids in coffee. **Phytochemical Analysis**, vol. 13, n°2, p. 99-104, 2002.

KARIMI TORSHIZI, M.A.; RAHIMI, S.H.; MOJGANI, N. ESMAEILKHANIAN, S. GRIMES, J.L. Screening of indigenous strains of lactic acid bacteria for development of a probiotic for poultry. **Asian Aust J. Anim. Sci.**, vol. 21, p. 1495-1500, 2008.

KONSTANTINOV, S.R.; KUIPERS, E.J., PEPPELENBOSCH, M.P. Functional genomic analyses of the gut microbiota for CRC screening. **Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology**, v. 10, p. 741-745, 2013.

KOS, B.; SUSKOVIC, J.; VUKOVIC, S. SIMPRAGA, M.; FRECE, J.; MATOSIC, S. Capacidade de adesão e agregação da cepa probiótica *Lactobacillus acidophilus* M92. **J. Appl. Microbiol.**, vol. 94, p. 981-987, 2003.

KRAUSOVA, G.; HYRSLOVA, I.; HYNSTOVA, I. In vitro evaluation of adhesin capacity, hydrophobicity, and auto-aggregation of newly isolated potential probiotic strains. **Journals Fermentation**, vol. 5, n°4, p. 100, 2019.

KUMAR, M.; DHILLON, S.; SINGHAL, A. SOOD, A.; GOSH, M.; GANGULI, A. Cell surface and stress tolerance properties of a newly isolated *Lactobacillus plantarum* CH1. **Acta alimentaria**, vol. 40, p. 38-44, 2011.

LEE, E.; ZANG, Z.; CHOI, E.Y.; SHIN, H.K. JI, G.E. Cytoskeleton reorganization and cytokine production of macrophages by Bifidobacterial cells and cell-free extracts. **Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 3, p. 398-405, 2002.

LI, C.; LI, W.; CHEN, X.; FENG, M.; RUI, X.; JIANG, M.; DONG, M. Microbiological, physicochemical and rheological properties of fermented soymilk produced with eopolysaccharide (EPS) producing lactic acid bacteria strains. **Food Science and Technology**, v. 52, n°2, p. 477-485, 2014.

LJUNG, A. & WADSTROM, T. Lactic acid bacteria as probiotics. *Curr. Iss.* **Intest. Microbiol.**, vol. 7, p. 73-90, 2006.

LORENZI, H. Palmeiras brasileiras e exóticas cultivadas. **Instituto Plantarum**, Nova Odessa, 160 p. 2004.

MACEDO, M.G; LACROIX, C. GARDNER, N.J.; CHAMPAGNE, C.P. Effect os medium supplementation on exopolysaccharide production by *Lactobacillus rhamnosus* RW-9595M in whey permeate. **International Dairy Journal**, v. 12, n°5, p. 419-426, 2002.

MAGALHÃES, K. T.; TAVARES, T.S.; GOMES, T.M.C.; NUNES, C.A. Effect of process variables on the yield and quality of jerivá (*Syagrus romanzoffiana*) kernel oil from aqueous extraction. **Grasas y aceites**, vol. 71, n° 1, 2020.



MATTILA-SANCHOLM, T.; MYLLARINEN, P.; CRITTENDEN, R.; MOGENSEN, G.; FONDÉN, R. SAARELA M. Technological challenges for future probiotic food. **Int Dairy J.**, vol. 12, p. 173-182, 2002.

MENDE, S.; ROHM, H. & JAROS, D. Influence of exopolysaccharides on the structure, texture, stability and sensory properties of yoghurt and related products. **International Dairy Journal**, v. 52, p. 57-71, 2016.

MENEZES, E.G.T.; CARMO, J.R.; MENEZES, A.G.T.; ALVES, J.G.L.F.; PIMENTA, C.J.; QUEIROZ, F. Use of different extractes of coffe pulp for the production of bioethanol. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v.169, nº2, p. 673-687, 2013.

MIGOT, I.; MARQUES, A.B.; ROCHA, I.; CAVALCANTI, A.; ARGOLO, S. Color evaluation of diferent brands and composite resin systems by spectrophotometer. **Journals Bahiana**, v.8, nº3, p. 68-75, 2017.

MISHRA, V.; Y PRASAD, D.N. Aplicación de métodos in vitro para la selección de cepas de Lactobacillus casei como probióticos potenciales. **Int. J. Food Microbiol.**, v. 103, p.109–115. 2005.

MONDRAGÓN-BERNAL, O.L. **Desenvolvimento de uma bebida fermentada a partir do extrato hidrossolúvel de soja, contendo agentes probióticos e prebióticos.** 2004. 103 p. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Alimentos) – Universidade Estadual de Campinas.

MONDRAGÓN-BERNAL, O.L. **Desenvolvimento de alimento simbiótico fermentado de soja.** 2009. 218 p. Tese (Doutorado em Engenharia de Alimentos) – Universidade Estadual de Campinas.

MONDRAGÓN-BERNAL, O.L.; TEIXEIRA, M.A.; ALVES, J.G.L.F.; RODRIGUES, M.I.; MAUGERI, F.F. Stability and functionality of synbiotic soy food during shelf-life. **Journal of Functional Foods**, v.35, p.134-145, 2017.

MURTHY, P. S. & NAIDU, M. M. Resources, Conservation and Recycling Sustainable management of coffee industry by-products and value addition — A review. **“Resources, Conservation & Recycling”**, v. 66, p. 45–58, 2012.

OBERG, T.S.; STEELE, J.L.; INGHAM, S.C.; SMEIANOV, V.V.; BRINCZINSKI, E.P.; ABDALLA, A. Intrinsic and inducible resistance to hydrogen peroxide in Bifidobacterium species. **Journal of industrial. Microbiology and Biotechnology.** v. 38, p. 1947-1953, 2011.

OJANSIVU, I.; FERREIRA, C.L.; SALMINEN, S. Yacon, a new source of prebiotic oligosaccharides with a history of safe use. **Trends in Food Science & Technology**, v.22, p. 40-46, 2011.

OLEJNIK, A.; LEWANDOWSA, M; OBARSA, M.; GRAJEK, W. Tolerance of Lactobacillus and Bifidobacterium strains to low PH, bile salts and digestive enzymes. **Electron J. Polish Agric. Univ.**, vol. 8, p. 5, 2005.

OKOCHI, M.; SUGITA, T.; ASAI, Y.; TANAKA, M.; HONDA, H. Screening of peptides associated with adhesion and aggregation of *Lactobacillus rhamnosus* GG in vitro. **Biochem. Eng. J.**, vol. 128, p. 178-185, 2017.

PANESAR, P.S.; KAUR, G.; PANESAR, R.; BERA, M.B. Simbióticos: potenciais suplementos alimentares em alimentos funcionais. **Central de Ciência de Alimentos**, 2009.

PEDRESCHI, R.; CAMPOS, D.; NORATTO, G.; CHIRINOS, R.; CISNEROS-ZEVALLOS, L. Andean yacon root (*Smallanthus sonchifolius* Poepp. Endl) fructooligosaccharides as a potential novel source of prebiotics. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.51, p. 5278-5284, 2003.

RAYMOND, Y. & CHAMPAGNE, C. P. The use of flow cytometry to accurately ascertain total and viable counts of *Lactobacillus rhamnosus* in chocolate. **Food Microbiology**, v. 46, p. 176–183, 2015.

RODRIGUES M.I & IEMMA A.F. Planejamento de Experimentos e Otimização de Processos. 2ª Ed. Campinas, São Paulo: Editora Cárita; 2014.

SANTOS, C.C.A.A.; LIBERCK, B.S.; SCHWAN, R.S. Co-culture fermentation of peanut-soy silk for the development of a novel functional beverage. **International Journal of Food Microbiology**, v. 186, p. 32-41, 2014.

SAVADOGO, A.; OUATTARA, C., SAVADOGO, P.W.; BARRO, N.; OUATTARA, A.S.; TRAERÉ, A.S. Identification of exopolysaccharides-producing lactic acid bacteria from Burkina Faso fermented milk samples. **African Journal of Biotechnology**, vol. 3, nº3, pág. 189-194, 2004.

SONG, C.; CAO, Y.; LYNNETTE, R.; QUAN SHU, F.; GARG, S. Flow cytometric assessment of the protectants for enhanced in vitro survival of probiotic lactic acid bacteria through simulated human gastro-intestinal stresses. **Applied Microbiology and Biotechnology**, vol. 95, nº 2, p 345+, 2012.

SHARMA M.; SHUKLA, G. Metabiotics: One step ahead of probiotics; an insight into mechanisms involved in anticancerous effect in colorectal cancer. **Frontiers in Microbiology**, v.7, p.1940, 2016.

SHAKIROVA, L.; GRUBE, M.; GAVARE, M.; AUZINA, L.; ZIKMANIS, P. *Lactobacillus acidophilus* La5 and *Bifidobacterium lactis* Bb12 cell surface hydrophobicity and survival of the cells under adverse environmental conditions. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, vol. 40, nº1, p. 85-93. 2013.

SHAR-ZAMMARETTI, P. & UBBINK., J. The cell wall of lactic acid bacteria: surface constituents and macromolecular conformations. **Biophys J.**, vol. 85, p. 4076-4092, 2003.

SHAR-ZAMMARETTI, P.; DILLMANN, M.L.; D'AMICO, N. AFFOLTER, M.; UBBINK, J. Influence of fermentation medium composition on physicochemical surface properties of *Lactobacillus acidophilus*. **Appl. Environ. Microbiol.** Vol. 71, p. 65-73, 2005.

SHENDEROV, B.A. Metabiotics: Novel idea or natural development of probiotic conception. **Microbial Ecology in Health and Disease**, v. p. 1-8, 2013.

SHENGBIN, H.; XINYI, H.; TIANXUN, H.; WENQIANG, Z.; YINGXING, Z.; LINA, W.; XIAOMEI, Y. Rapid quantification of live; dead lactic acid bacteria in probiotic products using high-sensitivity flow cytometry. **Methods and Applications in Fluorescence**, vol. 6, nº2, 2017.

TEIXEIRA, M.A. **Estudos cinéticos da produção de fermentado simbiótico de soja**. Dissertação (Mestrado em Ciência dos Alimentos) - Universidade Federal de Lavras, Minas Gerais, Brasil, 2017.

TREVELYAN, W.E. & HARRISON, J.S. Studies on yeast metabolism. 1: fractionation and microdetermination of cell carbohydrates. **Biochem. J.**, 50, pp. 298-303, 1952.

TSILINGIRI, K.; RESCIGNO, M. Postbiotics: What else? **Beneficial Microbes**, v.4, p. 101-107, 2013.

Vinderola C.G., Mocchiutti P., Reinheimer J.A. Interactions among lactic acid starter and probiotic bacteria used for fermented dairy products. **J Dairy Sci.** v. 85, nº 4, p. 721-29, 2000.

ZHUGE, A; SHENGJE L.; YIN YUAN; BO L; LANJUAN LI. The synergy of dietary supplements *Lactobacillus salivarius* LI01 and *Bifidobacterium longum* TC01 in alleviating liver failure in rats treated with D-galactosamine. **Food & Function**, nº 12, p. 10239-10252, 2021.

WANG, C.; ZHENG, H.; LIU, T.; WANG, D.; GUO, M. Physicochemical Properties and Probiotic Survivability of Symbiotic Corn-Based Yogurt-Like Product. **Journal of Food Science**, v. 82, nº9, 2017.

WANG, L.; ZHAO, B.; LIU, B.; YANG, C.; YU, B.; LI, Q.; MA, C.; XU, P.; MA, Y. Efficient production of L-lactic acid from cassava powder by *Lactobacillus rhamnosus*. **Bioresource Technology**, v. 101, nº 20, p. 7895-7901, 2010.

WILKES, J.G.; TUCKER R.K.; MONTGOMERY J.A.; COOPER, W.M.; SUTHERLAND, J.B.; BUZATU, D.A. Redução da interferência da matriz alimentar por uma combinação de preparação de amostras e técnicas de *gating* multidimensional para facilitar a análise rápida e de alta sensibilidade para *Escherichia coli* sorotipo O157 por citometria de fluxo. **Food Microbiol.**, V. 30, págs. 281 – 288, 2012.

## APÊNDICES

### APÊNDICE A

A Tabela 17 representa o esquema de tempo e velocidade de injeção das amostras do DCCR no sistema cromatógrafo para avaliação dos ácidos por HPLC.

Tabela 17 - Tempo e Velocidade de injeção no sistema cromatográfico

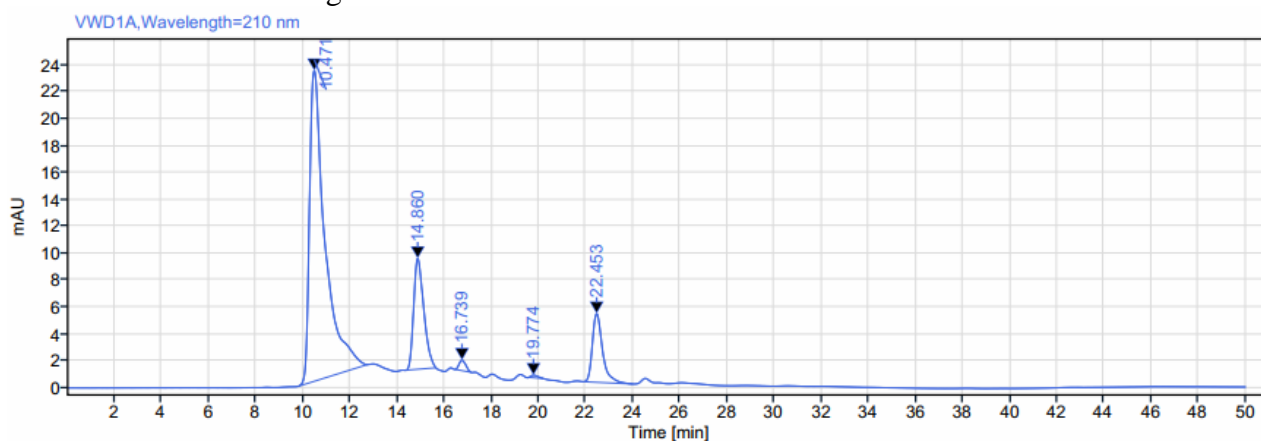
Tempo (min)	Velocidade do Fluxo (mL/min.)
0	0,5
13	0,3
16	0,5
24	0,8
28	0,5
50	0,5

Fonte: Do Autor, 2021.

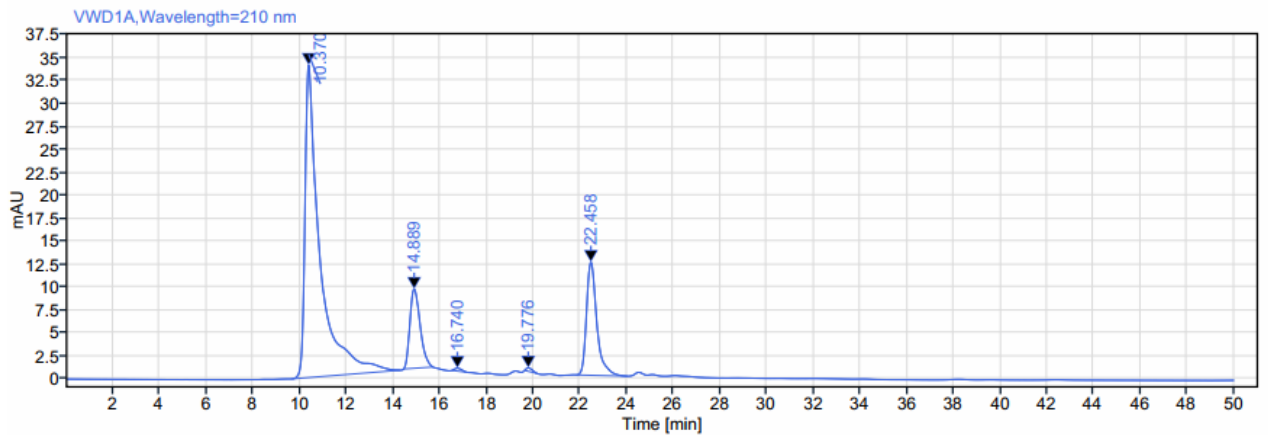
### APÊNDICE B

As Figuras 6 e 7, ilustram os cromatogramas de tempo inicial (t0) e tempo final (tf) de todos os tratamentos do DCCR avaliados em HPLC.

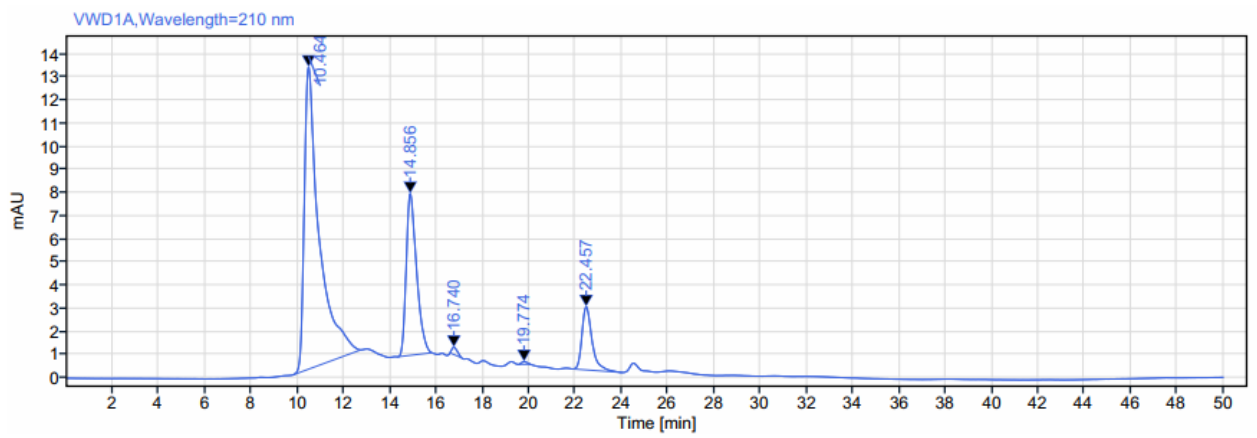
Figura 6.- (a) Cromatograma T2t0; (b) Comatograma T3t0; (c) Cromatograma T5t0; (d) Cromatograma T6t0; (e) Cromatograma T7t0; (f) Cromatograma T8t0 e (g) Cromatograma T9t0.



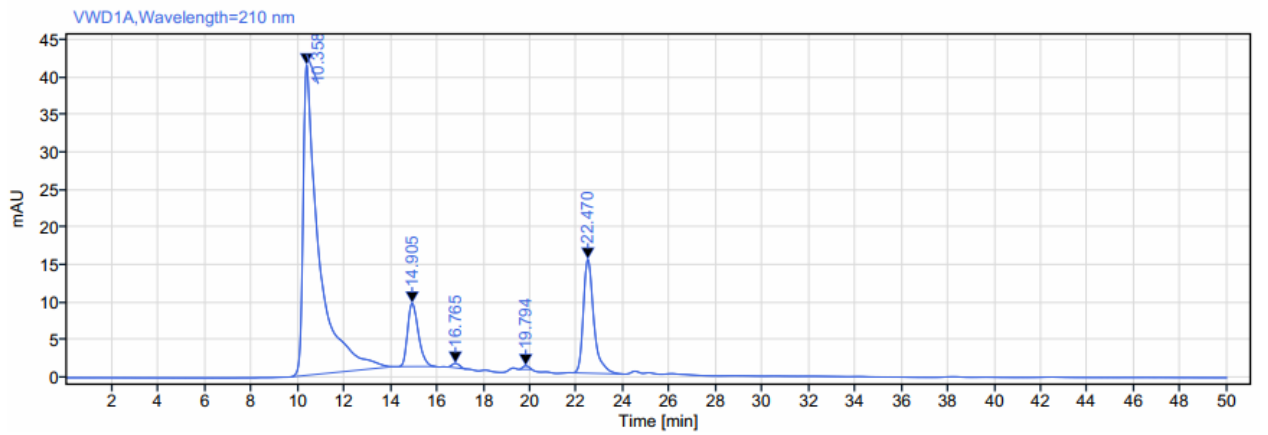
(a)



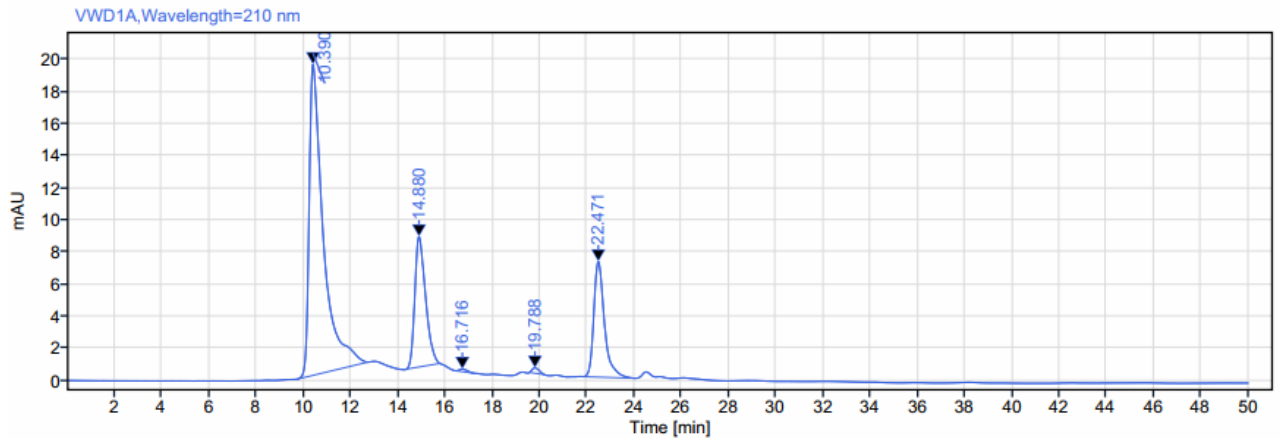
(b)



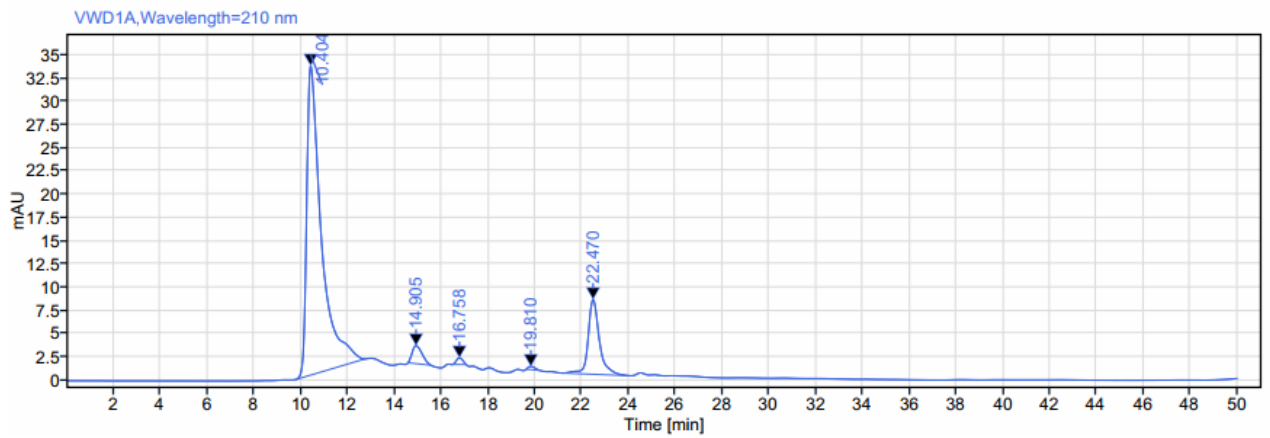
(c)



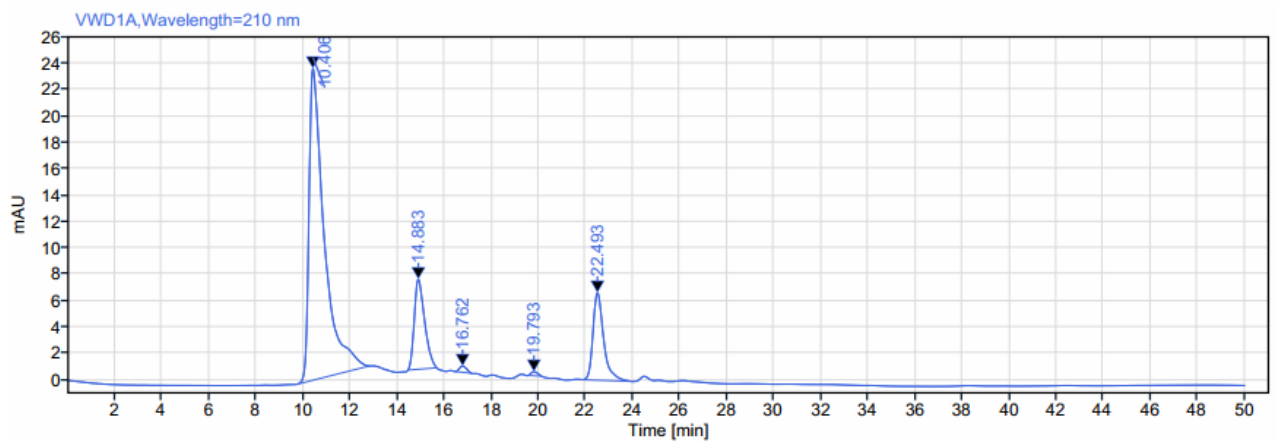
(d)



(e)



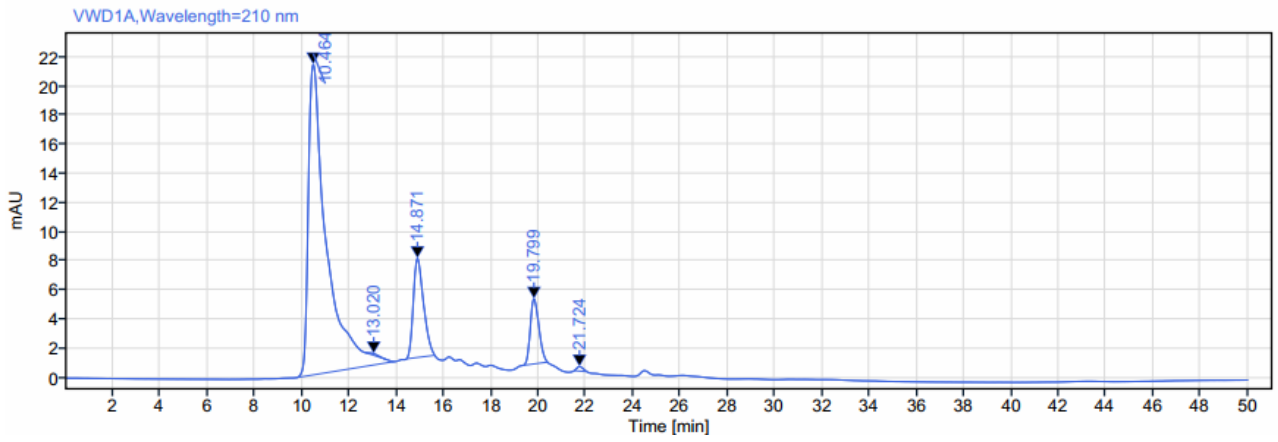
(f)



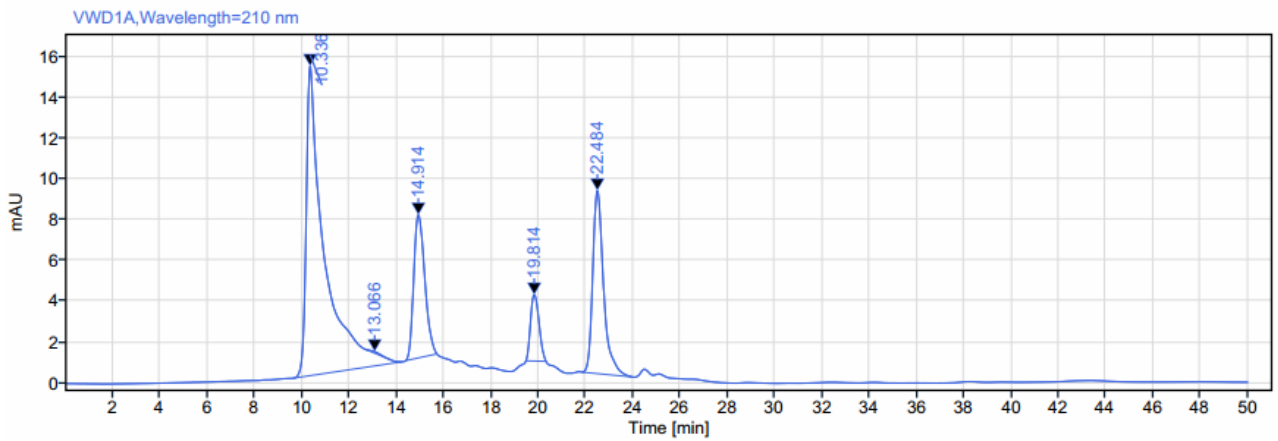
(g)

Fonte: Do Autor, 2021.

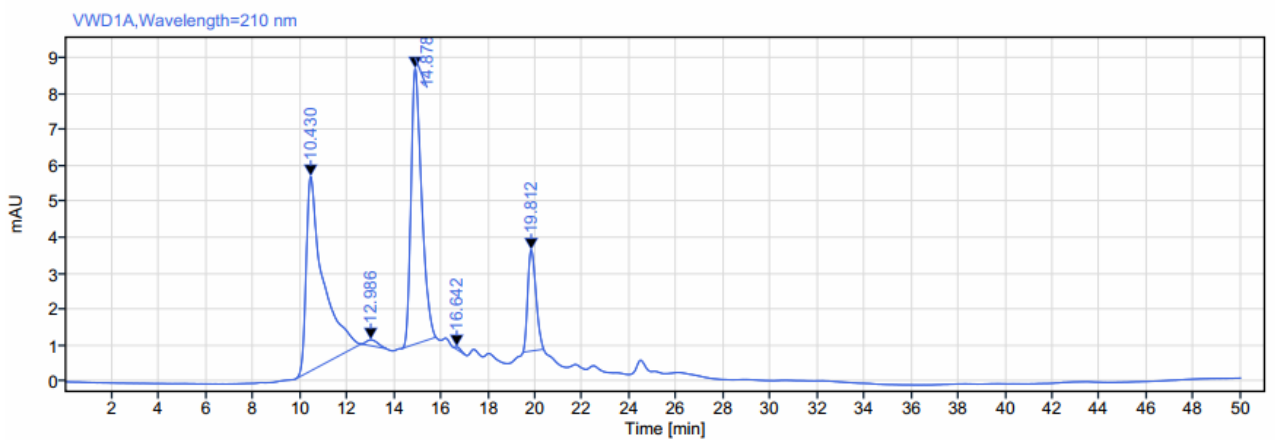
Figura 7.- (a) Cromatograma T2tf; (b) Cromatograma T3tf; (c) Cromatograma T5tf; (d) Cromatograma T6tf; (e) Cromatograma T7tf; (f) Cromatograma T8tf e (g) Cromatograma T9tf.



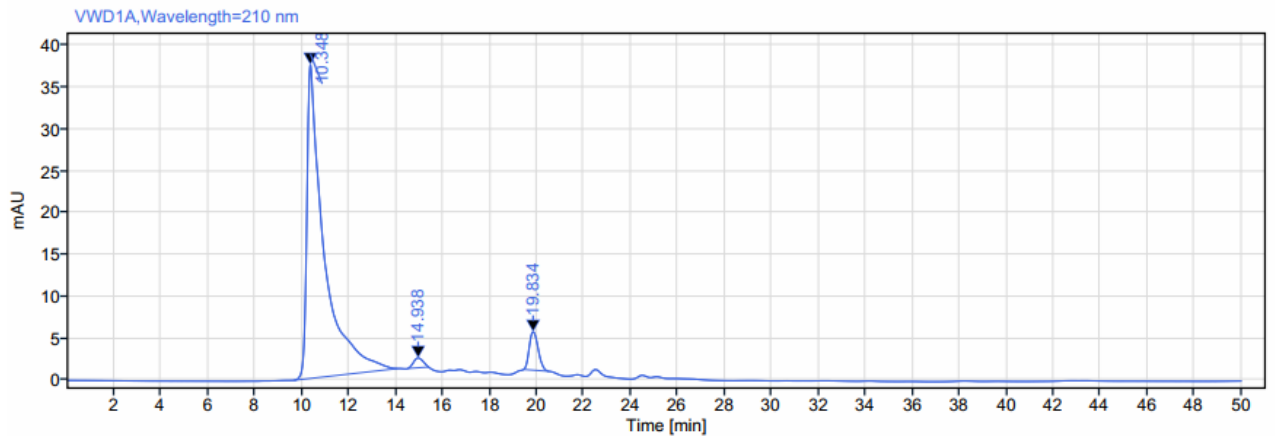
(a)



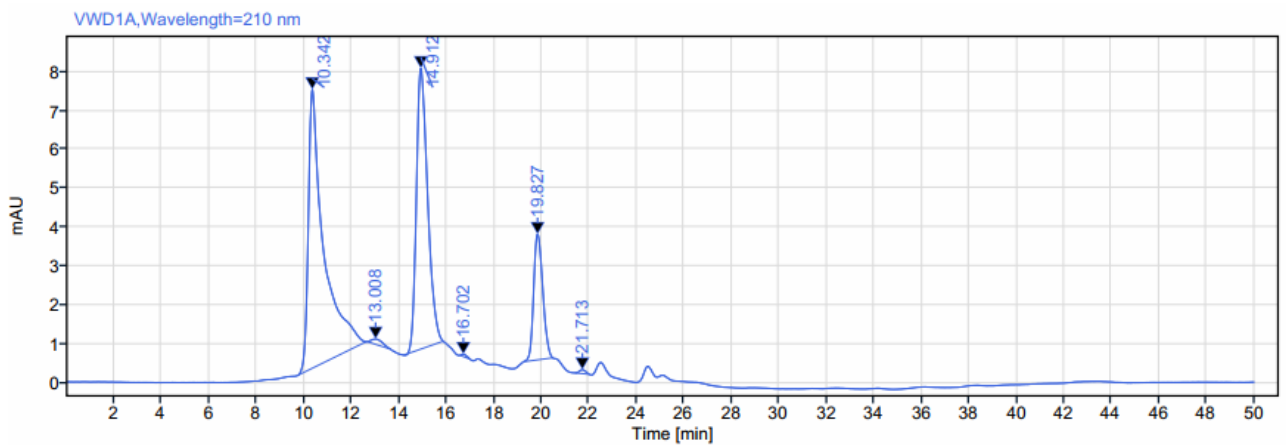
(b)



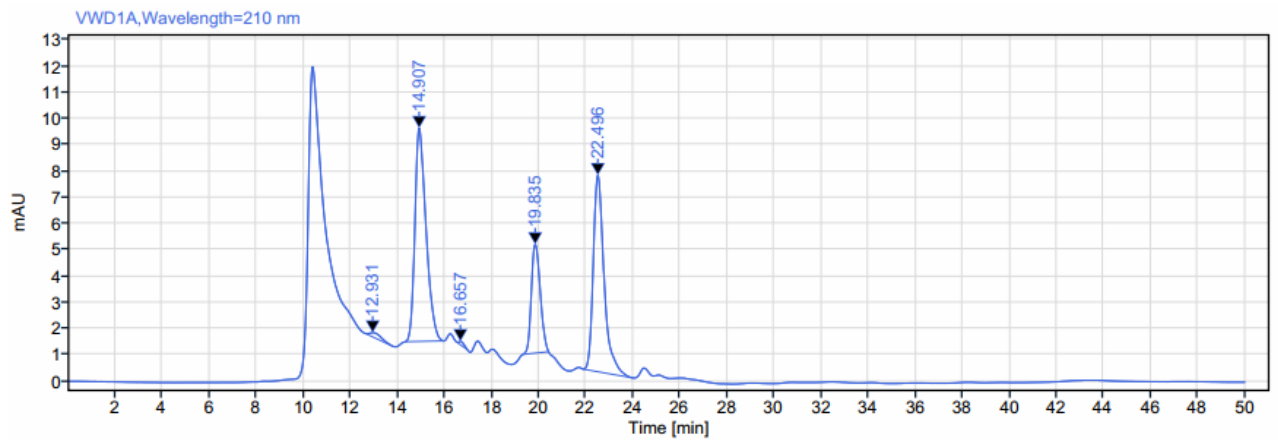
(c)



(d)

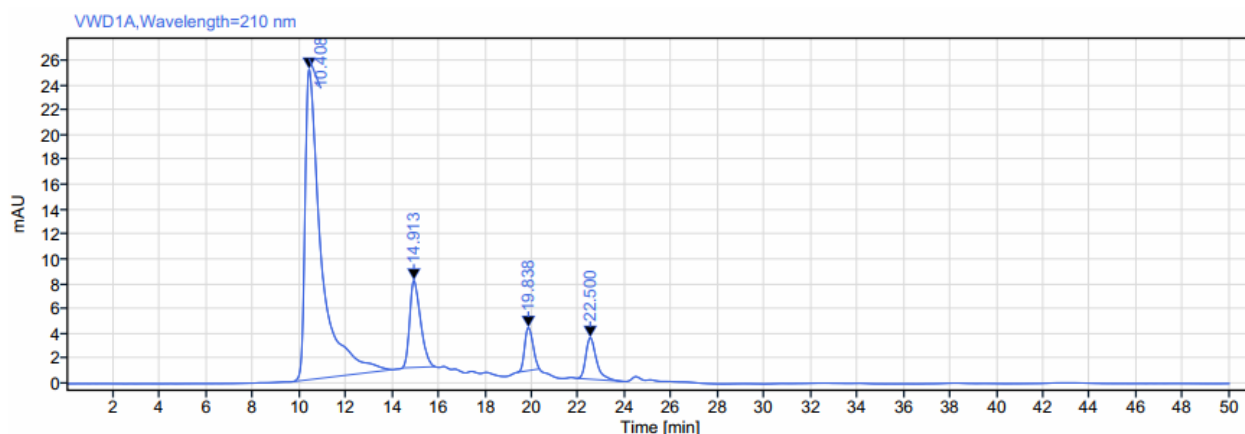


(e)



(f)





(g)

Fonte: Do Autor, 2021.

### APÊNDICE C

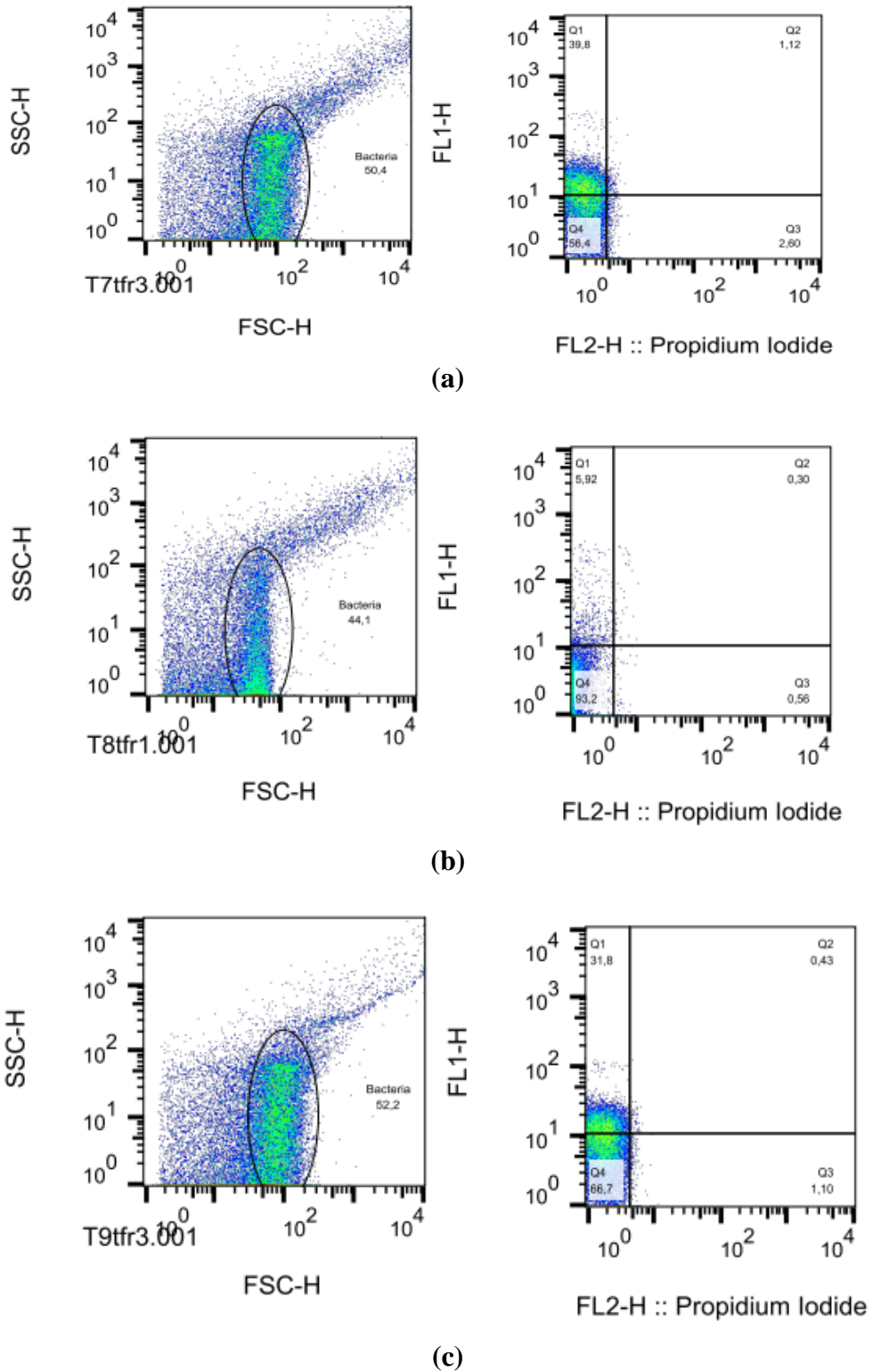
A Tabela 18 representa os resultados para os tratamentos do DCCR de tempo final em que não houveram boa captura da distribuição celular inviabilizando a análise sobre os resultados (Tratamentos 7, 8 e 9) A Figura 8 representa os histogramas obtidos para esses casos. A Figura 9 representa o histograma gerado de todos os tratamentos do tempo inicial ( $t_0$ ), que não foram apresentados no corpo do artigo.

Tabela 18 - Resultados da concentração de células vivas, mortas, injuriadas e não marcadas dos tratamentos 7, 8 e 9 de tempo final do DCCR

Tratamentos	Quadrante 1 (Q1) – (%) Vivas	Quadrante 2 (Q2) - (%) Injuriadas	Quadrante 3 (Q3) – (%) Mortas	Quadrante 4 (Q4) – (%) Sem Marcação
7	39±1,13	0,44±0,22	2,19±0,57	63,3±5,51
8	13,64±18,73	6,9±11,69	9,35±15,71	96,6±4,80
9	33,03±1,56	29,85±7,56	21,7±2,21	66,7±2,20

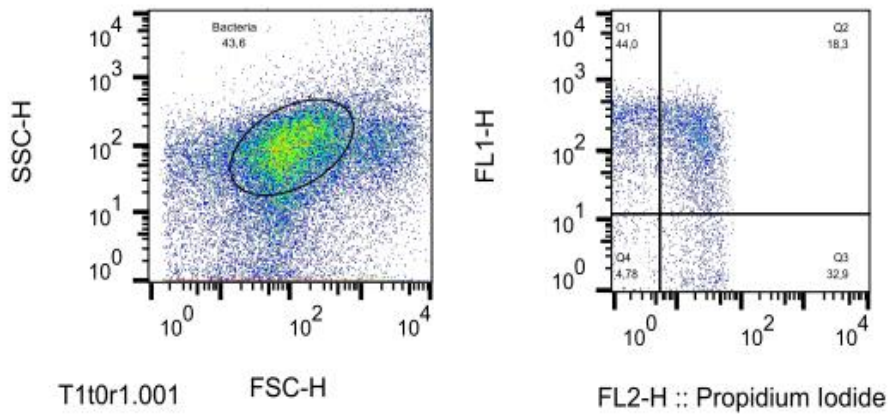
Fonte: Do Autor, 2021.

Figura 8. - (a) Histograma T7tf; (b) Histograma T8tf; (c) Histograma T9tf.

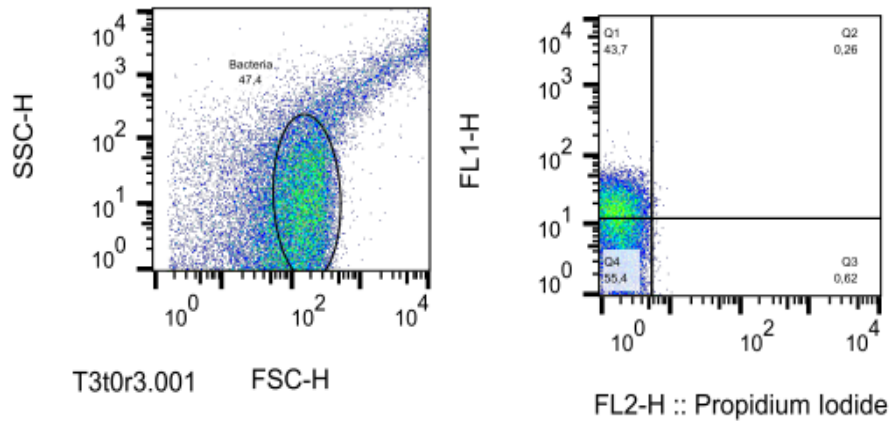


Fonte: Do Autor, 2021.

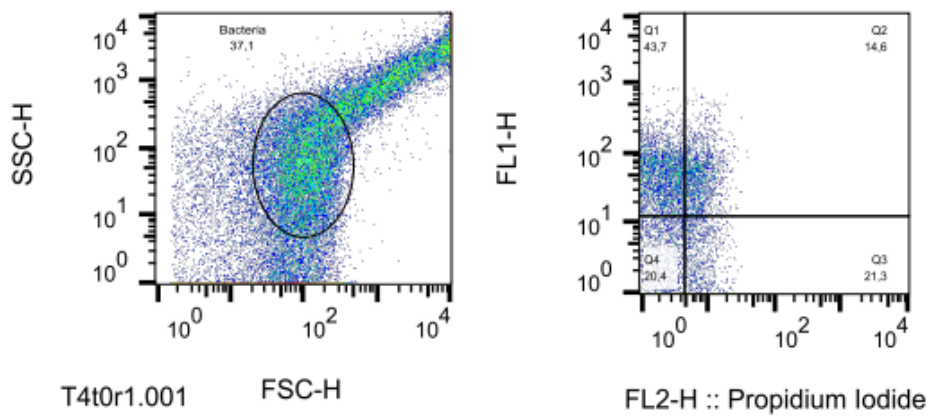
Figura 9. - (a) Histograma T1to; (b) Histograma T3to; (c) Histograma T4to; (d) Histograma T5to; (e) Histograma T6to; (f) Histograma T7to; (g) Histograma T8to e (h) Histograma T9to.



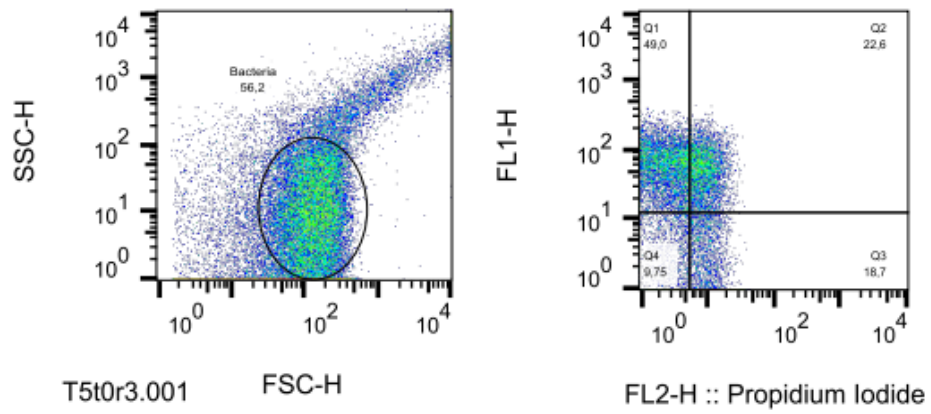
(a)



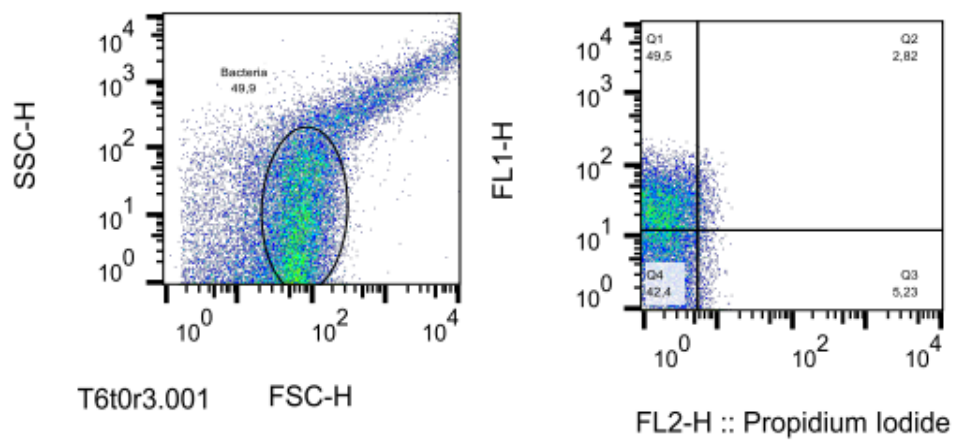
(b)



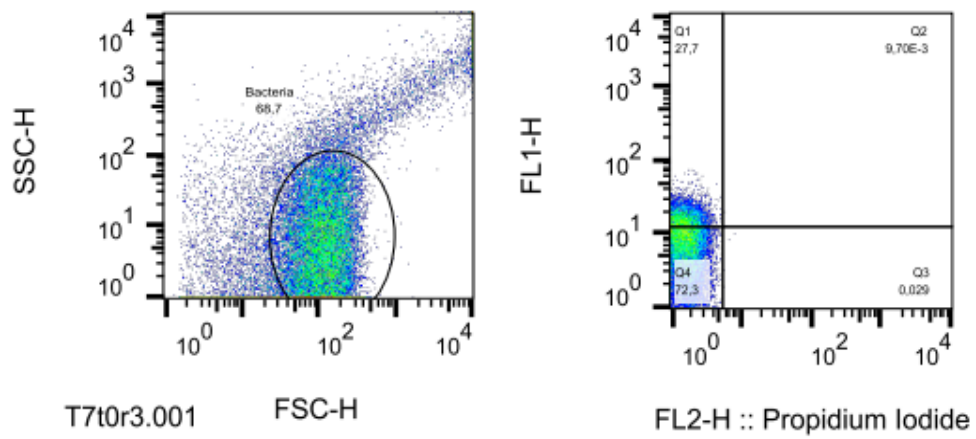
(c)



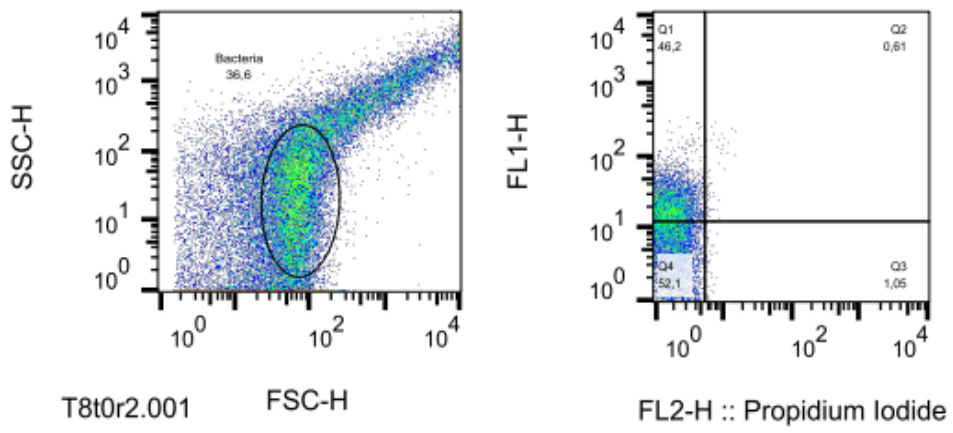
(d)



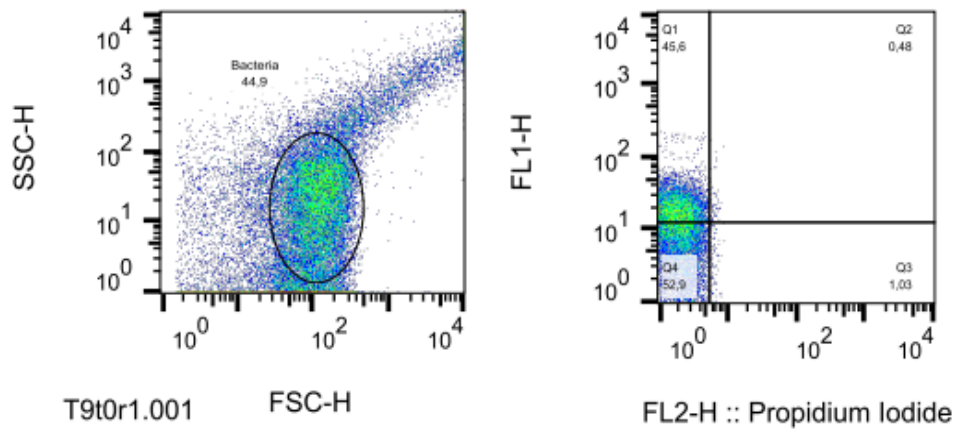
(e)



(f)



(g)



(h)

Fonte: Do Autor, 2021.