



KATHERINE LESLIE AYRES MOURA

**DESENVOLVIMENTO DE BEBIDA PROBIÓTICA À BASE DE
POLPA E EXTRATO DE AMÊNDOA DE CUPUAÇU
(*Theobroma grandiflorum*)**

**LAVRAS – MG
2023**

KATHERINE LESLIE AYRES MOURA

**DESENVOLVIMENTO DE BEBIDA PROBIÓTICA À BASE DE POLPA E
EXTRATO DE AMÊNDOA DE CUPUAÇU (*Theobroma grandiflorum*)**

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.

Profa. Dra. Olga Lucía Mondragón Bernal
Orientadora

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

**LAVRAS – MG
2023**

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

Moura, Katherine Leslie Ayres.

Desenvolvimento de bebida probiótica à base de polpa e extrato
de amêndoa de cupuaçu (*Theobroma grandiflorum*) / Katherine
Leslie Ayres Moura. - 2023.

117 p. : il.

Orientador(a): Olga Lucía Mondragón Bernal.

Coorientador(a): José Guilherme Lembi Ferreira Alves.

Dissertação (mestrado acadêmico) - Universidade Federal de
Lavras, 2023.

Bibliografia.

1. Alimentos funcionais. 2. *Theobroma grandiflorum*. 3.
Delineamento Plackett&Burman. I. Bernal, Olga Lucía Mondragón.
II. Alves, José Guilherme Lembi Ferreira. III. Título.

KATHERINE LESLIE AYRES MOURA

**DESENVOLVIMENTO DE BEBIDA PROBIÓTICA À BASE DE POLPA E
EXTRATO DE AMÊNDOA DE CUPUAÇU (*Theobroma grandiflorum*)**

**DEVELOPMENT OF PROBIOTIC BEVERAGE BASED ON CUPUAÇU
PULP AND EXTRACT (*Theobroma grandiflorum*)**

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.

APROVADA em 27 de fevereiro de 2023.
Dra. Olga Lucía Mondragón Bernal UFLA
Dr. Diego Alvarenga Botrel UFLA
Dra. Tânia Maria Alberte UNIR

Profa. Dra. Olga Lucía Mondragón Bernal
Orientadora

**LAVRAS – MG
2023**

Dedico este trabalho primeiramente a Deus, pôr ser essencial em minha vida, autor de meu destino, meu guia, socorro presente na hora da angústia.

Com muito carinho dedico para todos os que que fizeram de meu sonho realidade, aos que me proporcionaram forças para que eu não desistisse de ir atrás do que almejava. Muitos obstáculos foram impostos durante esses últimos anos, mas graças a vocês, continuei em frente. Obrigada por tudo, família, professores, amigos e colegas.

AGRADECIMENTOS

Gostaria de expressar a minha sincera gratidão a todos os que, direta ou indiretamente, me apoiaram ao longo deste mestrado. Gostaria de ressaltar algumas pessoas cujo apoio foi fundamental para a sua realização.

Meu agradecimento vai, em primeiro lugar, para minha orientadora deste projeto, Professora Dra. Olga Lucía e seu esposo e coorientador Professor Dr. José Guilherme, muito obrigada, pela disponibilidade em ouvir-me com paciência, agradeço ainda a confiança e o incentivo pessoal e profissional.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Fundação de Amparo à Pesquisa de Minas Gerais (FAPEMIG), meu agradecimento pelo apoio financeiro ao projeto.

Agradeço também ao corpo docente do Departamento de Engenharia de Alimentos da Universidade Federal de Lavras, pelos seus ensinamentos em sala de aula, que foram de extrema importância para o meu processo de experiência prático-pedagógica. Ao técnico Fabrício Lelis da Silva por todo conhecimento e ajuda compartilhados durante as análises no HPLC.

Agradeço em especial a Ricardo Ruiz, Nayara Thalita, Maria Luiza, Andreia Venancio e Joana Moratto pela força, atenção, ajuda, apoio e brincadeiras nesse tempo que compartilhamos, sem vocês muita coisa não seria possível alcançar.

Aos meus pais, Sebastião (*in memoriam*) e Tereza, por todo apoio que sempre me proporcionaram, pela educação que me ofereceram e pelos valores que me deram. Sou grata principalmente por exigirem sempre mais de mim e por terem me ensinado que o meu futuro dependia exclusivamente do meu trabalho e esforço.

A todos os colegas e amigos de curso e de laboratório, uns que me acompanharam já desde o início e outros que conheci no decorrer do curso, e que ao longo destes, de alguma forma me ofereceram sugestões e críticas para a realização deste projeto.

A família e aos amigos de longa data também agradeço por todos os bons momentos que me proporcionaram.

“Talvez não tenha conseguido fazer o melhor, mas lutei para que o melhor fosse feito. Não sou o que deveria ser, mas Graças a Deus, não sou o que era antes.”

(Martin Luther King)

RESUMO

O mercado global de alimentos funcionais está em constante crescimento e um alimento que tem despertado interesse é o cupuaçu. Essa fruta tropical possui um alto valor nutritivo, propriedades funcionais e potencial para agregar valor aos produtos alimentícios. Com o objetivo de avaliar o efeito de variáveis de formulação e fermentação do meio à base da polpa e extrato hidrossolúvel da amêndoa do cupuaçu, foram realizados testes preliminares com três microrganismos: *Saccharomyces boulardii*-17 (SB), *Lactobacillus rhamnosus* LR32 (LR) e *Bifidobacterium longum* BL04 (BL). Nesses testes, foi analisada a capacidade de fermentação de cada microrganismo, bem como sua viabilidade. Foram observadas a cinética de crescimento celular, os açúcares redutores e totais (AR e AT), o pH e a acidez titulável total (ATT). Na cinética de fermentação dos protótipos, os ensaios com SB e LR apresentaram as maiores contagens de crescimento celular total (CCT), com um aumento de 3,1 ciclos Log UFC.mL⁻¹ para ambos os microrganismos. Além disso, esses ensaios também mostraram maiores consumos de açúcares totais, sendo que o meio contendo SB apresentou um maior consumo de açúcares redutores. Em seguida, foi realizado um delineamento Plackett&Burman 12 com 4 pontos centrais e 7 variáveis independentes: proporção de LR:SB, temperatura (T, °C), polpa de cupuaçu (PC, % m/v), extrato hidrossolúvel da amêndoa do cupuaçu (EHAC, % v/v), farinha de arroz (FA, %m/v), sacarose comercial (SC, %m/v) e pH. As respostas foram: CCT [contagem final(CF) - inicial(CI)], pH, acidez total, AR e AT e exopolissacarídeos (EPS), nos tempos inicial 0h e final (8h e 12h). Constatou-se que as variáveis que exerceram efeitos estatisticamente significativos e positivos sobre o crescimento celular total (CCT) foram a temperatura e o teor de EHAC. O ensaio 7 com apenas SB (37°C; 20% EHAC) apresentou o maior CCT com aumento de 2,81 ciclos Log UFC.mL⁻¹ em 8h. Os ensaios dos pontos centrais 50:50 (LR:SB) obtiveram os melhores resultados na produção de EPS cerca 2,0 g/L. O ensaio 5 com apenas LR (37°C; 20% EHAC; 12h) e pontos centrais 50:50 (LR:SB) apresentaram os maiores consumos de AT e para AR foram os ensaios 6 (37°C, SC=8%, 12h) e ponto central. O ensaio 5 apresentou a maior variação do pH após 12h de fermentação (5,19 até 4,46) e maior produção de ácido lático após 8h de fermentação (419,88%). Em relação à funcionalidade pós-probiótica, foi constatado que a sobrevivência dos microrganismos após a fase intestinal foi em média de 31%, perdendo até 4 ciclos Log UFC/mL e ficando com contagens inferiores a 3 logUFC/mL. Esses resultados indicam que a contagem celular não foi suficiente para uma colonização efetiva do intestino grosso, sendo recomendado que a contagem seja mantida em pelo menos 6 logUFC/mL. Em conclusão, os microrganismos SB e LR foram capazes de fermentar o meio à base de polpa e extrato de amêndoas de cupuaçu, resultando em uma opção não convencional para o mercado de bebidas funcionais. Recomenda-se a fermentação com os microrganismos individualmente, uma vez que a mistura não contribuiu para o aumento do crescimento celular.

Palavras-chave: Alimentos funcionais. *Theobroma grandiflorum*. Delineamento Plackett&Burman. *Saccharomyces boulardii*-17. *Lactobacillus rhamnosus* LR32.

ABSTRACT

The global market for functional foods is constantly growing, and one food that has attracted interest is cupuaçu. This tropical fruit has high nutritional value, functional properties, and the potential to add value to food products. In order to evaluate the effect of formulation and fermentation variables in a medium based on cupuaçu pulp and hydro-soluble extract of cupuaçu almond, preliminary tests were conducted with three microorganisms: *Saccharomyces boulardii*-17 (SB), *Lactobacillus rhamnosus* LR32 (LR), and *Bifidobacterium longum* BL04 (BL). In these tests, the fermentation capacity and viability of each microorganism were analyzed. The kinetics of cell growth, reducing and total sugars (RS and TS), pH, and total titratable acidity (TTA) were observed. In the fermentation kinetics of the prototypes, the assays with SB and LR showed the highest total cell growth counts (TCGC), with an increase of 3.1 Log CFU/mL for both microorganisms. Additionally, these assays also exhibited higher consumption of total sugars, with the SB-containing medium showing higher consumption of reducing sugars. Next, a Plackett&Burman 12 design was employed with 4 central points and 7 independent variables: LR:SB ratio, temperature (T, °C), cupuaçu pulp (CP, % w/v), hydro-soluble extract of cupuaçu almond (HECA, % v/v), rice flour (RF, % w/v), commercial sucrose (CS, % w/v), and pH. The responses analyzed were TCGC (final count (FC) - initial count (IC)), pH, total acidity, RS, TS, and exopolysaccharides (EPS) at initial time (0h) and final times (8h and 12h). The variables that exerted statistically significant and positive effects on TCGC were temperature and HECA content. Assay 7, with only SB (37°C; 20% HECA), presented the highest TCGC with an increase of 2.81 Log CFU/mL in 8h. The assays at the central points with a 50:50 LR:SB ratio obtained the best results in EPS production, reaching around 2.0 g/L. Assay 5, with only LR (37°C; 20% HECA; 12h), and the central points with a 50:50 LR:SB ratio showed the highest consumption of TS, while for RS, assays 6 (37°C, CS=8%, 12h) and the central point had the highest values. Assay 5 exhibited the highest pH variation after 12h of fermentation (from 5.19 to 4.46) and the highest lactic acid production after 8h of fermentation (419.88%). Regarding post-probiotic functionality, it was observed that the survival of microorganisms after the intestinal phase averaged 31%, losing up to 4 Log CFU/mL and resulting in counts below 3 Log CFU/mL. These results indicate that the cell count was not sufficient for effective colonization of the large intestine, and it is recommended to maintain the cell count at least at 6 Log CFU/mL. In conclusion, SB and LR microorganisms were able to ferment the cupuaçu pulp and almond extract-based medium, resulting in a non-conventional option for the functional beverage market. It is recommended to ferment with individual microorganisms, as the mixture did not contribute to increased cell growth.

Keywords: Functional foods. *Theobroma grandiflorum*. Plackett&Burman design. *Saccharomyces boulardii*-17. *Lactobacillus rhamnosus* LR32.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.1 - Características morfológicas do Cupuaçuzeiro. a) Planta Cupuaçuzeiro, b) flor, c) e d) frutos sem e com sementes.	21
Figura 1.2 - Morfologia do fruto de cupuaçu. a) Fruto de cupuaçu, b) corte transversal do fruto de cupuaçu.	22
Figura 1.3 - Mecanismos de interação entre microbiota, probióticos e hospedeiro. A microbiota normal e os probióticos interagem com o hospedeiro em atividades metabólicas e funções imunes e evitam a colonização de microrganismos oportunistas e patogênicos.	35
Figura 1.4 - Conceitualização dos termos paraprobióticos e pós-bióticos.	40
Figura 1.5 - Prebiótico, probiótico, paraprobiótico e pós-biótico. ALC, ácido linoleico conjugado; AGPI, ácido graxo poliinsaturado; FOS, frutooligossacarídeos; GOS, galacto-oligossacarídeos; MOS, mananoligossacarídeo; XOS, xilooligossacarídeo.	40
Figura 2.1 - Fluxograma obtenção da polpa e extrato hidrossolúvel da amêndoa de cupuaçu.	58
Figura 2.2 - Curva cinética da contagem total (CT)	70
Figura 2.3 - Cinéticas de pH x ATT ao longo de 24h de fermentação de polpa de cupuaçu e EHAC por probióticos.	72
Figura 2.4 - % de produção de ácido acético e ácido láctico após 8h de fermentação das bebidas probióticas a base de cupuaçu, ensaios definidos pelo delineamento experimental.	90
Figura 2.5 - % de consumo de ácido cítrico após 8h de fermentação das bebidas probióticas a base de cupuaçu, ensaios definidos pelo delineamento experimental Plackett&Burman.	91
Figura 2.6 - Porcentagem de Hidrofobicidade (%H) das linhagens puras de L.r. (<i>Lactobacillus rhamnosus</i>), S.b. (<i>Saccharomyces boulardii</i>) e tempos finais (8h e 12h) de fermentação das bebidas elaboradas a base de cupuaçu.	98
Figura 2.7 - Declínio da viabilidade celular após passagem dos ensaios em condições simuladas do aparelho digestório humano.....	102
Figura 2.8 - Gráfico de Pareto de Efeitos Padronizados - variável: CCT 8h	113
Figura 2.9 - Gráfico de Pareto de Efeitos Padronizados - variável: CCT 12h	113
Figura 2.10 - Gráfico de Pareto de Efeitos Padronizados - variável: AR 8h.....	114
Figura 2.11 - Gráfico de Pareto de Efeitos Padronizados - variável: AR 12h.....	114
Figura 2.12 - Gráfico de Pareto de Efeitos Padronizados - variável: AT 8h.....	115
Figura 2.13 - Gráfico de Pareto de Efeitos Padronizados - variável: AT 12h.....	115
Figura 2.14 - Gráfico de Pareto de Efeitos Padronizados - variável: EPS 8h	116

Figura 2.15 - Gráfico de Pareto de Efeitos Padronizados - variável: EPS 12h	116
Figura 2.16 - Gráfico de Pareto de Efeitos Padronizados - variável: Ácido Lático 8h	117
Figura 2.17 - Gráfico de Pareto de Efeitos Padronizados - variável: Ácido Acético 8h	117

LISTA DE TABELAS

Tabela 1.1 - Características físico-químicas e concentrações de macro e oligoelementos na polpa, semente, amêndoas seca e torrada de cupuaçu.	23
Tabela 1.2 - Compostos voláteis detectados em polpa de cupuaçu ($\mu\text{g}/\text{kg}$).	25
Tabela 1.3 - Efeitos benéficos e aplicações terapêuticas atribuídos a bactérias probióticas em humanos. Alguns critérios de seleção para microrganismos probióticos.	36
Tabela 1.4 - Mecanismos de interação entre probióticos, prebióticos e hospedeiro. A simbiose entre microbiota e hospedeiro pode ser otimizada com intervenções farmacológicas ou nutricionais no ecossistema microbiano intestinal usando probióticos ou prebióticos.	36
Tabela 2.1 - Relação entre valores codificados e reais utilizados no Plackett&Burman 12. ...	59
Tabela 2.2 - Matriz do Planejamento Plackett&Burman 12 com 4 pontos centrais.	59
Tabela 2.3 - Caracterização físico-químicas da polpa e extrato hidrossolúvel da amêndoa do cupuaçu.	66
Tabela 2.4 - Cinética de crescimento de células em meio contendo polpa de cupuaçu e EHAC – Contagem total (CT).	69
Tabela 2.5 - Alteração de pH ao longo da fermentação de meio contendo polpa de cupuaçu e EHAC com probióticos.	71
Tabela 2.6 - Análise da acidez titulável total.	71
Tabela 2.7 - Cinética de consumo de açúcares totais em meio fermentado a base de polpa de cupuaçu e EHAC por probióticos.	73
Tabela 2.8 - Análise de consumo de açúcares redutores.	73
Tabela 2.9 - Contagem dos microrganismos e crescimento celular durante a fermentação dos ensaios realizados do delineamento P&B12.	78
Tabela 2.10 - Análise de açúcares totais durante a fermentação dos ensaios realizados do delineamento P&B12.	80
Tabela 2.11 - Análise de açúcares redutores durante a fermentação dos ensaios realizados do delineamento P&B12.	82
Tabela 2.12 - Análise de exopolissacarídeos durante a fermentação dos ensaios realizados do delineamento P&B12.	85
Tabela 2.13 - Análise de pH durante a fermentação dos ensaios realizados do delineamento P&B12.	86

Tabela 2.14 - Análise da Acidez Titulável Total durante a fermentação dos ensaios realizados do delineamento P&B12.....	88
Tabela 2.15 - % de produção e consumo de ácidos orgânicos após 8h de fermentação das bebidas probióticas a base de cupuaçu e relação de ácido láctico e ácido acético dos ensaios definidos pelo delineamento experimental Plackett&Burman.	90
Tabela 2.16 - Plackett & Burman para formulação e seleção de microrganismos para desenvolvimento de bebida probiótica à base de cupuaçu.	93
Tabela 2.17 - Resumo dos efeitos das variáveis independentes e coeficiente de variação explicada para as respostas do delineamento experimental Plackett & Burman 12.....	94
Tabela 2.18 - Coordenadas de cor.	97
Tabela 2.19 - Contagem dos microrganismos e crescimento celular durante a fermentação dos ensaios com maiores taxas de crescimento celular realizados do delineamento P&B12.	101
Tabela 2.20 - Contagem total dos microrganismos após realização dos testes de resistência ao aparelho digestório in vitro.....	101

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

A	Ácido acético
AGCC	Ácidos graxos de cadeia curta
AGPI	Ácido graxo poliinsaturado
ALC	Ácido linoleico conjugado
AR	Açúcares redutores
AT	Açúcares totais
ATT	Acidez titulável total
BAL	Bactérias do ácido láctico
BL	<i>Bifidobacterium longum sp</i>
CB	Contagem de bifidobactéria
CCT	Crescimento celular total
CI	Contagem inicial
CF	Contagem final
CL	Contagem de Lactobacilos
CLAE	Cromatografia líquida de alta eficiência
CT	Contagem total
EHAC	Extrato hidrossolúvel de amêndoa do cupuaçu
EPS	Exopolissacarídeos
FA	Farinha de arroz
FB	Fibra bruta
FC	Fator de crescimento
FOS	Frutooligossacarídeo
FUFOSE	Functional Food Science in Europe
GALT	Tecido Linfoide Associado ao Intestino
GOS	Galacto-oligossacarídeos
HPLC	High-performance liquid chromatography
L	Ácido Láctico
LR	<i>Lactobacillus rhamnosus sp</i>
MOS	Mananoligossacarídeo
P&B12	Plackett -Burman12
PB	Proteína bruta
SB	<i>Saccharomyces boulardii-17</i>
SC	Sacarose comercial
UFC	Unidade Formadora de Colônias
XOS	Xilooligossacarídeo

SUMÁRIO

Capítulo 1	INTRODUÇÃO GERAL	16
1.	INTRODUÇÃO.....	16
2.	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	18
2.1	Consumo de frutas.....	18
2.2	Cupuaçu (<i>Theobroma grandiflorum</i> (Willd. ex Spreng.) K. Schum)	20
2.3	Alimentos funcionais.....	27
2.4	Prebióticos, probióticos e simbióticos.....	29
2.4.1	<i>Lactobacillus</i> , <i>Bifidobacterium</i> e <i>Saccharomyces boulardii</i>	32
2.4.2	Mecanismos de ação dos probióticos	34
2.4.3	Uso de probióticos em fermentações de suco de frutas.....	37
2.5	Paraprobóticos e pós-bióticos.....	38
2.6	Avaliação de probióticos para uso em alimentos	41
2.7	Resistência de probióticos ao aparelho digestório e adesão às superfícies mucosas	42
3.	CONSIDERAÇÕES GERAIS	45
	REFERÊNCIAS	46
Capítulo 2	ARTIGO	54
1.	INTRODUÇÃO.....	55
2.	MATERIAL E MÉTODOS.....	56
2.1	MATÉRIA-PRIMA.....	56
2.1.1	Ativação e Propagação dos Microrganismos Liofilizados	57
2.1.1.1	Ativação e propagação de <i>S. boulardii</i>	57
2.1.1.2	Ativação e propagação de Lactobacilos e Bifidobactérias	57
2.1.2	Processamento do Cupuaçu e Obtenção do Extrato Hidrossolúvel	58
2.2	PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL.....	59
2.3	FERMENTAÇÃO	60
2.3.1	Ensaio Preliminares	60
2.4	DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DOS PROBIÓTICOS TOTAIS	61
2.4.1	Contagem Padrão em Placas	61
2.5	CARACTERIZAÇÃO DA COMPOSIÇÃO CENTESIMAL DA MATÉRIA-PRIMA.....	61
2.6	ANÁLISES FÍSICO-QUÍMICAS	61
2.6.1	Acidez titulável total e pH.....	61
2.6.2	Determinação de açúcares redutores e totais.....	62
2.7	COR INSTRUMENTAL.....	62

2.8	DETERMINAÇÃO DE EXOPOLISSACARÍDEOS (EPS).....	62
2.8.1	Extração do EPS Bruto.....	62
2.8.2	Quantificação de EPS pelo Método de Antrona.....	62
2.9	DETERMINAÇÃO DE ÁCIDOS ORGÂNICOS	63
2.10	TESTES <i>IN VITRO</i> DE RESISTÊNCIA DE PROBIÓTICOS ÀS CONDIÇÕES SIMULADAS DO APARELHO DIGESTÓRIO HUMANO.....	63
2.10.1	Digestão <i>in vitro</i>	63
2.11	TESTE DE HIDROFOBICIDADE.....	64
2.12	ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	65
3.	RESULTADOS E DISCUSSÃO	65
3.1	COMPOSIÇÃO CENTESIMAL	65
3.2	PRÉ-TESTES	68
3.3	RESULTADOS DO P&B12	74
3.3.1	Ácidos orgânicos	89
3.3.2	Plackett & Burman 12 - efeitos das variáveis independentes	92
3.3.3	Cor instrumental	96
3.3.4	Teste de funcionalidade.....	98
3.3.4.1	Hidrofobicidade.....	98
3.3.4.2	Resistência de probióticos às condições simuladas do aparelho digestório humano.....	99
4.	CONSIDERAÇÕES FINAIS	103
	REFERÊNCIAS	105
	APÊNDICE A	113

Capítulo 1 INTRODUÇÃO GERAL

1. INTRODUÇÃO

As políticas de saúde pública enfatizam a importância de estilos de vida saudáveis, incluindo atividade física suficiente e consumo de fibras (DE BRUIJN et al., 2012). Frutas frescas são um componente essencial de uma dieta saudável e equilibrada e o aumento do consumo desses alimentos, com baixo valor calórico, é uma estratégia alimentar proposta para auxiliar na redução da ingestão de energia e no aumento da qualidade alimentar (DA SILVA et al., 2014; MACHADO-MOREIRA et al., 2019; RAYNOR; OSTERHOLT, 2012; VILLACÍS-CHIRIBOGA et al., 2020).

O cupuaçu (*Theobroma grandiflorum* (Willd. ex Spreng.) K. Schum) vem se evidenciando como um dos frutos regionais amazônicos, com crescente divulgação no território brasileiro, considerado um fruto tropical natural, saudável e ambientalmente amigável com diferentes aplicações potenciais na indústria agroalimentar (CARVALHO; GARCÍA; FARFÁN, 2008; SOUZA et al., 2020).

O crescimento considerável do interesse da população sobre temas relacionados à saúde e bem-estar, levando a um aumento na demanda por alimentos com efeitos benéficos para a saúde. Essa demanda está ligada a um impulso para o aumento de alimentos funcionais que forneçam ingredientes que melhorem a saúde convenientemente (SILVA et al., 2020).

O cupuaçu é considerado um alimento com potencial funcional, devido sua fonte potencial de fibra alimentar, principalmente fibra solúvel. A polpa possui também uma quantidade considerável de amido e polissacarídeos de pectina, conferindo uma textura distinta das demais polpas de frutas, além de ser fonte de ácido ascórbico, compostos fenólicos e de compostos bioativos, que fazem com que esse alimento se destaque como uma fruta de alto valor nutricional (COSTA et al., 2015; CURIMBABA et al., 2020; PEREIRA et al., 2017).

O mercado global de bebidas funcionais é um setor crescente da indústria de alimentos. Os probióticos, suplementos alimentares contendo microrganismos vivos, e os prebióticos, conceitualizados como carboidratos não-digeríveis que promovem o crescimento e/ou a atividade de um grupo de bactérias no cólon, são considerados alimentos funcionais, pois são capazes de atingir o intestino e modificar a composição da microbiota, melhorando seu funcionamento e conferindo efeitos benéficos à saúde do hospedeiro. Por apresentarem diversos benefícios, diferentes produtos funcionais são desenvolvidos usando probióticos e prebióticos

(MONDRAGÓN-BERNAL; MAUGERI, 2008; SOUZA et al., 2010; MONDRAGÓN-BERNAL et al., 2017; GUIMARÃES et al., 2019; STIEMSMA et al., 2020).

O lançamento de produtos com probióticos em meios não lácteos tem aumentado nos últimos anos, em parte devido ao sucesso dos alimentos biofuncionais e ao aumento dos consumidores veganos ou intolerantes a componentes do leite. As bebidas probióticas não lácteas são especialmente interessantes para os consumidores que são intolerantes à lactose, alérgicos ao leite ou que o evitam por qualquer outro motivo, baixo teor de colesterol e status vegano (VILLEGAS; CARBONELL; COSTELL, 2008; MARSH et al., 2014; HERNÁNDEZ-TORRES, 2019).

Desta maneira, novas matrizes alimentares como portadoras de probióticos são, cada vez mais estudadas. Sucos de frutas inoculados com microrganismos probióticos apresentaram resultados promissores (PEREIRA et al., 2017).

Existem vários estudos que investigam a fermentação com probióticos em cupuaçu, e que avaliam esta fermentação, indicando que o cupuaçu é uma boa matriz para a produção da bebida probiótica, indicando aumento da concentração de ácido láctico, redução do pH, melhoramento na atividade antioxidante do cupuaçu. A fermentação com probióticos ocasionaram o melhoramento da qualidade sensorial do cupuaçu e aumentar sua vida útil, além de destacaram que a fermentação com probióticos pode aumentar a tolerância do cupuaçu a condições adversas de armazenamento, como temperatura e umidade (PEREIRA et al., 2017; MENEZES et al., 2018; SILVA et al., 2020)

Além disso, o cupuaçu contém importantes compostos bioativos como o ácido ascórbico, associado à boa viabilidade das bactérias lácticas ao longo da fermentação, indicando que bebida de cupuaçu se mostrou mais vantajosa para o crescimento dos probióticos devido à presença natural desse ácido na fruta (PEREIRA et al., 2017).

Desta maneira, este experimento teve com o objetivo estudar as condições de fermentação realizando estudo da cinética de fermentação para avaliar a influência de diferentes probióticos, selecionar o(s) melhor(es) microrganismo e/ou combinações, otimizando as características funcionais e físico-químicas dos probióticos elaborados à base de cupuaçu e extrato hidrossolúvel da amêndoa do cupuaçu, visando a obtenção de um produto fermentado funcional com probióticos e prebióticos.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Consumo de frutas

As políticas de saúde pública enfatizam a importância de estilos de vida saudáveis, incluindo atividade física suficiente e consumo de fibras, como a ingestão adequada de frutas (DE BRUIJN et al., 2012). Frutas frescas são um componente essencial de uma dieta saudável e equilibrada, e o aumento do consumo desses alimentos, com baixa densidade energética, é uma estratégia alimentar proposta para auxiliar na redução da ingestão de energia e no aumento da qualidade alimentar. Além disso, seu consumo aumentou em todo o mundo nos últimos anos, e esse consumo não é mais apenas um resultado de gosto e preferência pessoal, transformando-se em um cuidado com a saúde devido ao conteúdo vital de nutrientes, e promovendo estilos de vida mais saudáveis (DA SILVA et al., 2014; MACHADO-MOREIRA et al., 2019; RAYNOR; OSTERHOLT, 2012; VILLACÍS-CHIRIBOGA et al., 2020).

Além dos nutrientes essenciais, a maioria das frutas contém quantidades relevantes de micronutrientes, como minerais, fibras, vitaminas e compostos fitoquímicos secundários (DA SILVA et al., 2014). Além disso, as frutas possuem alto teor de água e fibras, bem como seu baixo teor de gordura. Mais recentemente, estas foram reconhecidas por suas qualidades saciantes, essencialmente, devido à quantidade de fibras solúveis presentes no alimento, quanto mais fibras solúveis tiver a fruta, maior é a duração da sensação de saciedade. Acredita-se que a qualidade saciante dos alimentos de baixo teor calórico permite que os indivíduos consumam uma boa quantidade de alimentos, mas, devido ao baixo teor de energia, mantenha a ingestão de energia baixa. Por exemplo, uma pesquisa experimental recente descobriu que quando a sopa de vegetais é servida antes de uma entrada, a ingestão geral de energia na refeição é reduzida em comparação com quando nenhuma sopa de vegetais é servida. Assim, uma dieta com excesso de alimentos com baixo teor calórico, como frutas, deve ajudar na redução da ingestão geral de energia (RAYNOR; OSTERHOLT, 2012).

Evidências crescentes mostram a importância de micronutrientes para o benefício da saúde humana. Uma dieta rica em fitoquímicos como carotenóides e compostos fenólicos, demonstrou fornecer uma alta concentração de compostos antioxidantes com vários benefícios subsequentes à saúde, como redução de riscos de doenças como certos tipos de doenças neurodegenerativas, câncer, catarata, degeneração macular e inflamação cardiovascular (DA SILVA et al., 2014; DUARTE et al., 2010; VILLACÍS-CHIRIBOGA et al., 2020).

O Brasil é o terceiro maior produtor de frutos, responsável por 5,4% da produção mundial, porém a fruticultura Amazônica corresponde menos de 0,76% desse total (ABRAFUTAS, 2022; EMBRAPA, 2022). A agricultura tradicional da Amazônia é produzida na maior parte por raízes nativas, hortaliças, frutos exóticos e plantas medicinais, aplicadas para consumo in natura e para fabricação de produtos processados (CANUTO et al., 2010).

Atualmente, vem ocorrendo um crescimento do reconhecimento econômico de produtos e subprodutos de algumas frutíferas específicas, devido ao aumento da preocupação do consumidor com a ligação que existe entre dieta e saúde. A caracterização física e química das frutas e a quantificação de componentes bioativos são essenciais para a obtenção do valor nutricional, e importante do ponto de vista comercial, podendo aderir valor e qualidade ao produto final. Em relação às substâncias com características funcionais em alimentos, compostos com propriedades antioxidante têm ganhado bastante reconhecimento, pois estes auxiliam na proteção do organismo humano na prevenção do estresse oxidativo, evitando e protegendo de uma série de patógenos crônico-degenerativos (CANUTO et al., 2010).

Como consequência desse conhecimento, nos últimos anos houve um incremento significativo no comércio e aquisição de frutas. Especificamente, o consumo de frutas tropicais, uma importante fonte de carboidratos, vitaminas, minerais e fibras, está aumentando nos mercados doméstico e internacional devido ao crescente reconhecimento de seu valor nutricional e terapêutico. O sabor exótico, busca incessante por novos produtos, a alta concentração de nutrientes e nutracêuticos tornam as frutas tropicais uma oportunidade muito interessante para os produtores locais, sendo a produção e comercialização uma boa forma de aumentar a renda do pequeno produtor, em uma maneira que respeita a natureza (DUARTE et al., 2010; ROGEZ et al., 2004; VILLACÍS-CHIRIBOGA et al., 2020).

Existem mais de 3000 tipos de frutas tropicais produzidas anualmente no mundo. A produção global de frutas tropicais aumentou mais de 5% anualmente na última década. A variedade de frutas tropicais foi importada para os países não tropicais para garantir que haja demanda durante o ano todo por produtos frescos (FENG et al., 2015).

O Brasil possui muitas espécies de frutas nativas e exóticas subexploradas, de potencial interesse para serem utilizadas pela indústria de alimentos e na agroindústria, sendo uma possível fonte futura de renda para a população local. Representando uma possibilidade para os produtores locais conseguirem acesso a mercados especiais, onde os consumidores optam pelo caráter exótico e a presença de nutrientes capazes de precaver doenças degenerativas. Além disso, existe o uso potencial dessas polpas de frutas tropicais e seus subprodutos para isolar

fitoquímicos específicos para ser utilizado em suplementos nutracêuticos, aditivos alimentares, inovações alimentícias e farmacêuticas, colaborando para a recuperação de resíduos de processos agroindustriais, com tem grandes impactos industriais, econômicos e ambientais. Portanto, a identificação e quantificação de fitoquímicos em polpas e subprodutos de frutas tropicais são de extrema importância para substanciar suas melhorias potenciais à saúde na nutrição humana (DA SILVA et al., 2014; DUARTE et al., 2010).

Novos usos e métodos diversificados para processar frutas tropicais precisam ser elaborados para reduzir as perdas de produção, estimular mais lucros e alavancar o uso sustentável de biomas, como o cerrado e a floresta amazônica (DUARTE et al., 2010). Hoje, a segurança alimentar é um problema crescente devido ao esgotamento dos recursos naturais e ao aumento da população, o que levou a uma lacuna entre produção e consumo. Portanto, é de extrema importância que as matérias-primas produzidas sejam usadas ao máximo. Da produção agrícola inicial até o consumo final das famílias, cerca de 1,3 bilhão de toneladas de alimentos são perdidas ou desperdiçadas (cerca de 35%), o que gera uma pegada de carbono de 3,3 bilhões de toneladas de CO₂Eq (VILLACÍS-CHIRIBOGA et al., 2020).

Os subprodutos das frutas são compostos por epicarpo (peles/cascas), sementes e polpa não aproveitadas acarretados por várias etapas do processo industrial e comumente não têm mais uso e geralmente são desperdiçados ou descartados. A economia do processamento de culturas tropicais pode ser melhorada através do desenvolvimento de um uso de maior valor para seus subprodutos. Tem sido relatado na literatura que vários subprodutos das frutas tropicais contêm altos níveis de várias substâncias que melhoram a saúde que podem ser extraídas para fornecer nutracêuticos. Além disso, a plena utilização de frutas pode levar a indústria a um agronegócio com menos resíduos, aumentando a lucratividade industrial. O uso de todo o tecido vegetal pode ter benefícios econômicos para os produtores e um impacto benéfico no meio ambiente, levando a uma maior diversidade de produtos (DA SILVA et al., 2014). A produção de alimentos fermentados seria uma possível utilização dessas frutas e subprodutos das frutas, com o propósito de melhoramento do sabor.

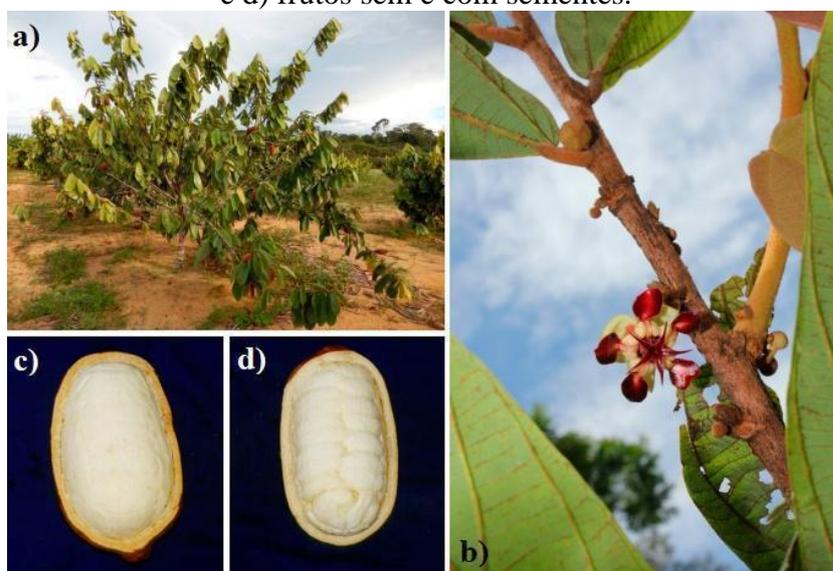
2.2 Cupuaçu (*Theobroma grandiflorum* (Willd. ex Spreng.) K. Schum)

Theobroma (Sterculiaceae), da família Malvaceae, é um gênero tropical americano, agrupa 22 espécies de árvores que crescem nas florestas tropicais da América Central e do Sul, nove das quais são nativas da Amazônia. O gênero é digno de nota porque inclui o “cacau” ou

chocolateiro economicamente importante (*Theobroma cacao* L.). *Theobroma grandiflorum*, conhecido como “cupuaçu”, é um fruto nativo da região amazônica pertencente ao mesmo gênero de cacau, amplamente distribuído na Amazônia Legal e América do Sul, é avaliada como uma das melhores e mais vantajosas árvores fruteiras da Amazônia, sendo o segundo, de seu gênero, em termos de importância econômica. O cupuaçuzeiro é uma árvore de tamanho médio, geralmente de 6 a 10 m, podendo chegar até 18 m de altura (Figura 1.1a). (CARVALHO; GARCÍA; FARFÁN, 2008; ORNELLAS et al., 2017; RAMOS et al., 2020). A produção dessa fruta teve um crescimento significativo nos últimos anos, um aumento em torno de 147% da produção, passando de 8.580 toneladas do ano de 2006 para 21.240 toneladas em 2017 (CENSO AGROPECUÁRIO IBGE, 2020).

O fruto do cupuaçuzeiro (Figuras 1.1c e 1.1d), é uma fruta tropical, nativa e muito popular da Amazônia brasileira, apreciado por sua polpa sabor ácido e fortemente aromática. Possui formatos diferentes (oblonga, oval, elíptica, obovóide ou redonda) e peso entre 200 e 4000 g. A polpa apresenta um pH de $3,5 \pm 0,2$, e seu teor de açúcar é cerca de 10,7%, enquanto as sementes têm um pH de 6,35 (CARVALHO; GARCÍA; WADA, 2005; COSTA et al., 2015; DUARTE et al., 2010; RAMOS et al., 2020; ROGEZ et al., 2004).

Figura 1.1 - Características morfológicas do Cupuaçuzeiro. a) Planta Cupuaçuzeiro, b) flor, c) e d) frutos sem e com sementes.

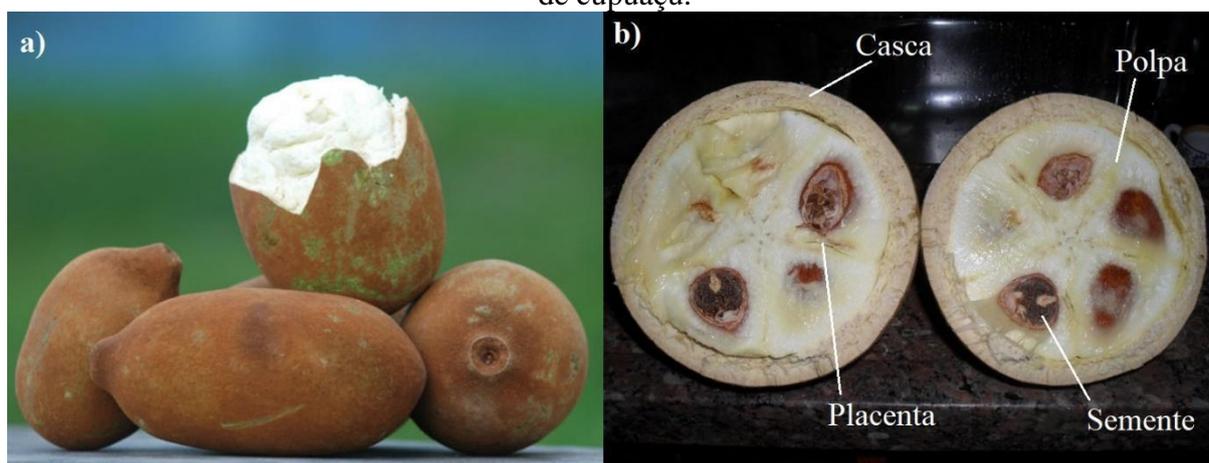


Fonte: SOUZA; ALVES; SOUZA, (2017)

O cupuaçu vem se evidenciando como um dos frutos regionais amazônicos, com crescente divulgação no território brasileiro, considerado um fruto tropical natural, saudável e ambientalmente amigável, ou seja, com manejo ambientalmente correto (sustentável) socialmente justo e economicamente rentável, com diferentes aplicações potenciais na indústria agroalimentar. Apesar de apresentar grande potencial, devido ao alto valor nutritivo, gera muitos resíduos, sendo praticamente descartados durante o beneficiamento do fruto para obtenção da polpa (GARCÍA; WADA, 2005; CARVALHO; GARCÍA; FARFÁN, 2008; PENA JÚNIOR (ORG.), 2011; CARVALHO; SOUZA et al., 2020).

O rendimento da polpa dos frutos varia conforme o tamanho, a procedência, o período de safra e a forma de extração. Os frutos (Figura 1.2) pesam em média 1,275 kg, cada fruta tem de 15 a 50 sementes cercadas por uma polpa, com cerca de 43% de casca, 38,5% de polpa, 17,19% de semente e 2,85% de placenta. A polpa possui coloração amarelada-branca, e é muito apreciada sensorialmente (FERREIRA; GUIMARÃES; MAIA, 2008; RAMOS et al., 2020). Na Tabela 1.1 são apresentadas as características físico-químicas e concentrações de macro e oligoelementos na polpa, semente, amêndoas secas e torradas de cupuaçu. No quadro a seguir as sementes são in natura, extraíndo o máximo possível da polpa aderida; e, as amêndoas secas são as sementes secas e fermentadas, realizando em seguida a despeliculagem.

Figura 1.2 - Morfologia do fruto de cupuaçu. a) Fruto de cupuaçu, b) corte transversal do fruto de cupuaçu.



Fonte: Compilação do autor^{1,2}.

¹ Casca do cupuaçu pode resultar em novo insumo para indústria de polímeros no Amazonas. **Acrítica**, 2016. Disponível em: <<https://www.acritica.com/channels/governo/news/casca-do-cupuacu-pode-resultar-em-novo-insumo-para-industria-de-polimeros-no-amazonas>>. Acesso em: 02 de fevereiro de 2021.

² Cupuaçu. **Toda Fruta**, 2016. Disponível em: <<https://www.todafruta.com.br/cupuacu/>>. Acesso em: 02 de fevereiro de 2021.

Tabela 1.1 - Características físico-químicas e concentrações de macro e oligoelementos na polpa, semente, amêndoas seca e torrada de cupuaçu.

Físico-Química	Polpa	Semente	Amêndoa	Amêndoa Torrada
Umidade (%)	89,2±0,3 [1]	6,92 [4]	6,07 [4]	
pH	3,5±0,2 [1]	6,35±0,01 [2]	5,41±0,03 [2]	5,27±0,03 [2]
acidez total titulável	3,5±0,0 [1]*	7,70±0,50 [2]**	11,69±0,75 [2]**	11,74±0,75 [2]**
Proteína (%)	8,8±1 [5]	9,43±0,12 [2]	8,89±0,36 [2]	8,63±0,22 [2]
Lipídios (%)	12,7±2,2 [5]	64,85±0,61 [2]	53,60±1,04 [2]	53,73±0,30 [2]
Cinzas (%)	5,3±0,5 [5]	2,94±0,02 [2]	2,02±0,01 [2]	2,15±0,04 [2]
Fibras (%)	14,3±0,6 [5]	3,28±0,05 [2]	6,51±0,98 [2]	7,638±0,44 [2]
Açúcares (%)	49,0±4,0 [5]	-	-	-
Glicose (% DM)	6,9±0,8 [5]	-	-	-
Frutose (% DM)	8,8±0,5 [5]	-	-	-
Sacarose (% DM)	34,6±1,7 [5]	-	-	-
ácido ascórbico (mg/g)	96-111 [6]	-	-	-
fenóis totais (mmol.L ⁻¹ ácido gálico)	0,4±0,0 [1]	-	-	-
ativ. antirradical livre (µmol.L ⁻¹ de Trolox)	0,6±0,2 [1]	-	-	-
aa essenciais (mg/g)				
treonina	40,9±0,30 [5]	59,2±0,4 [3]	57,21±1,5 [3]	56,66±1,1 [3]
valina	60,6±0,24 [5]	72,60±1,5 [3]	63,36±3,7 [3]	60,63±0,3 [3]
metionina	22,1±0,16 [5]	4,59±1,1 [3]	4,26±1,1 [3]	2,49±0,6 [3]
cistina	23,3±0,11 [5]	23,31±0,4 [3]	22,70±1,2 [3]	22,86±1,2 [3]
isoleucina	44,2±0,29 [5]	45,8±0,3 [3]	41,61±0,4 [3]	42,24±0,8 [3]
leucina	68,2±0,54 [5]	84,4±1,5 [3]	77,07±1,5 [3]	79,52±1,5 [3]
tirosina	39,0±0,20 [5]	37,06±0,7 [3]	43,50±1,5 [3]	42,74±1,1 [3]
fenilalanina	46,4±0,23 [5]	45,47±0,3 [3]	41,13±0,4 [3]	40,26±0,3 [3]
lisina	61,6±0,29 [5]	53,11±1,5 [3]	45,39±4,7 [3]	43,74±0,3 [3]
histidina	23,5±0,17 [5]	14,52±0,7 [3]	12,77±1,5 [3]	11,43±1,2 [3]
triptofano	-	12,99±0,1 [3]	14,609±0,7 [3]	12,92±0,4 [3]
aa não essenciais (mg/g)				
arginina	42,7±0,34 [5]	56,55±1,5 [3]	56,74±3,7 [3]	52,685±0,4 [3]
ácido aspártico	157,7±2,69 [5]	123,81±2,6 [3]	144,21±3,4 [3]	151,59±1,5 [3]
serina	47,3±0,16 [5]	53,11±3,4 [3]	59,57±2,3 [3]	58,15±2,2 [3]
ácido glutâmico	162,5±0,19 [5]	148,26±1,1 [3]	141,37±3,7 [3]	147,11±3,4 [3]
prolina	45,6±0,34 [5]	44,33±2,2 [3]	52,01±1,5 [3]	51,19±8,9 [3]
glicina	44,5±0,16 [5]	57,7±0,3 [3]	69,99±6,1 [3]	62,13±0,8 [3]
alanina	71,1±0,58 [5]	47,76±0,3 [3]	45,86±2,2 [3]	47,22±0,8 [3]
amônia	-	15,28±0,7 [3]	14,66±0,4 [3]	14,41±0,8 [3]
ácidos graxos (g/100g de ácidos graxos totais)				
ácido mirístico	0,12±0,03 [5]	-	-	-
ácido palmítico	55,22±0,62 [5]	7,54±0,08 [4]	-	-
ácido palmitoleico	0,56±0,15 [5]	-	-	-
ácido esteárico	3,12±0,15 [5]	32,6±0,1 [4]	-	-
ácido oleico	18,8±2,44 [5]	41,31±0,06 [4]	-	-
ácido linoleico	3,08±0,63 [5]	4,9±0,1 [4]	-	-
ácido α-linolênico	17,98±2 [5]	0,20±0,01 [4]	-	-
ácido margárico	-	0,19±0,01 [4]	-	-
ácido vacênico	-	0,47±0,02 [4]	-	-

ácido eicosanóico	-	10,51±0,04 [4]	-	-
ácido eicosenóico	-	0,34±0,01 [4]	-	-
ácido docosanóico	-	1,72±0,01 [4]	-	-
ácido tetracosanóico	-	0,19±0,01 [4]	-	-
ácido graxo saturado	1,4004 [5]	52,81±0,07 [4]	-	-
ácido graxo monoinsaturado	-	42,12±0,04 [4]	-	-
ácido graxo poliinsaturado	-	5,07±0,11 [4]	-	-
ácido graxo mono e poliinsaturado ω -6/ ω -3	0,9782 [5]	-	-	-
	-	0,1713 [4]	-	-
minerais e traços de elementos (μg/g amostra fresca)				
Al	0,8±0,3 [4]	2,1±0,3 [4]	-	-
B	0,3±0,1 [4]	2,9±0,1 [4]	-	-
Ca	96±9 [4]	369±9 [4]	-	-
Cl	87±21 [4]	340±31 [4]	-	-
Cu	0,4±0,1 [4]	2,7±0,1 [4]	-	-
Fe	2,7±0,3 [4]	7,5±0,3 [4]	-	-
K	3439±46 [4]	2621±24 [4]	-	-
Mg	93±2 [4]	802±9 [4]	-	-
Mn	0,6±0,1 [4]	2,7±0,1 [4]	-	-
P	118±2 [4]	730±4 [4]	-	-
S	334±7 [4]	177±4 [4]	-	-
Si	3±1 [4]	4±1 [4]	-	-
Sr	0,7±0,1 [4]	1,6±0,1 [4]	-	-
Zn	2,2±0,1 [4]	7,3±0,1 [4]	-	-

Legenda: *expresso em mg de ácido cítrico/100g de polpa; ** expresso em mEqNaOH/100g FW: peso fresco; SFA: ácido graxo saturado; UFA: ácido graxo insaturado; MUFA (PUFA): ácidos graxos mono e poliinsaturados

Fonte: [1] Canuto et al. (2010); [2] Carvalho; García; Wada (2005) [3] Carvalho; García; Farfán (2008) [4] Ramos (2015) [5] Rogez et al. (2004) [6] Pugliese et al. (2013)

Em relação às vitaminas, a cada 100g de polpa de cupuaçu são identificadas, em média, 1.800 μ g de vitamina B1, 215 μ g de vitamina B2, 3,200 mg de niacina e 26,5 mg de vitamina C (FERREIRA; GUIMARÃES; MAIA, 2008; RAMOS et al., 2020).

Dentre os macronutrientes presentes na polpa, destacam-se os carboidratos, sendo a sacarose o açúcar predominante (34,6% da matéria seca). Em relação aos ácidos graxos, a polpa possui ácido palmítico, oleico e α -linolênico em maior concentração do que qualquer outro ácido. A polpa possui uma quantidade apreciável de micronutrientes, como K, S, P e Mg em relação aos outros minerais. Nas sementes, o mineral K também é predominante. As sementes também possuem alto teor de proteínas e lipídios. A polpa de cupuaçu contém quase todos os aminoácidos essenciais (o triptofano não foi detectado) e alguns aminoácidos não essenciais (asparagina e glutamina são 15,77 e 16,25 g/100 g de proteína, respectivamente) e níveis notáveis de ácido ascórbico (~96–111 mg/g) (RAMOS et al., 2020).

Na polpa de cupuaçu podem ser identificados 21 compostos voláteis, os maioritariamente presentes são os ésteres, contendo essencialmente butanoato de etila, hexanoato de etila e ácido hexadecanóico. A concentração de compostos voláteis varia conforme o pH, sendo maior em amostras com pH 3,3. No total foram identificados 24 ésteres, 13 terpenos, 8 álcoois, 4 carbonilas, 4 ácidos, 2 lactonas e 1 fenol, conforme Tabela 1.2 (RAMOS, 2015).

Tabela 1.2 - Compostos voláteis detectados em polpa de cupuaçu ($\mu\text{g}/\text{kg}$).

COMPOSTOS	pH 3,3	pH 7
Acetato de etila	250	102
2-propanol	-	4
Etanol	77	29
Propanoato de etila	52	-
Propanoato de 3-metilbutila	20	-
Butanoato de etila	389	381
2-Metilbutanoato de etila	162	-
Acetato de butila	440	7
Acetato de 3-metilbutila	43	-
1-butanol	129	13
1-penten-3-ol	24	-
2-metil-2-pentenal	-	5
Mirceno	12	-
3-metilbutanol	3	2
Butanoato de butila	-	14
Hexanoato de etila	1253	359
(<i>E</i>)- β -Ocimeno	37	28
Acetato de 3-metil-3-buten-1-il	62	3
Acetato de hexila	201	4
Terpinoleno	15	-
3-hidroxi-2-butanona	102	-
3-metil-2-buten-1-ol	278	-
2-metilpentanoato de etila	40	12
1-hexanol	30	7
3 <i>Z</i> -Hexenol	18	6
Nonanal	19	-
Hexanoato de butila	79	5
Octanoato de etila	52	10
Óxido de (<i>Z</i>)-linalol (furanóide)	27	0
Óxido de (<i>E</i>)-linalol (furanóide)	31	8
Ácido acético	47	0
(<i>E,E</i>)-2,4-Heptadienal	5	-
Sorbato de etila	6	-
3-Hidroxibutanoato de metila	44	-
Linalol	986	104
3-Hidroxibutanoato de etila	86	-
B-Cariofileno	23	5
Decanoato de etila	37	6

Ácido butanóico	117	29
Butanoato de propila	48	5
3-Hidroxihexanoato de etila	520	-
α -Terpinol	440	89
Propanoato de linalil	111	51
Germacrene D	37	5
Nerol	12	0
Dodecanoato de etila	27	-
Geraniol	42	-
Ácido hexanóico	21	4
Acetato de 2-fenilpropila	37	2
γ -Octalactona	8	-
Ácido octanóico	70	-
Acetato de trans-Cinamil	32	21
Eugenol	35	15
δ -Decalactona	9	-
Acetato de cedrila	29	6
Acetato de (<i>E,E</i>)-farnesil	10	-

Legenda: - Não detectado
Fonte: Quijano; Pino (2007)

O cupuaçu possui uma casca marrom dura e sementes rodeadas por uma polpa amarelada-branca, com alto teor de fibras, apresenta excelentes características de aroma, sabor e textura, e vem ganhando ampla aceitação no Brasil e mercados internacionais, com grande potencial econômico. O seu valor econômico baseia-se, principalmente, na industrialização e comercialização da polpa, em razão ao seu sabor diferenciado e alta acidez, é comumente utilizada na preparação de bebidas, sucos, vinhos, cremes, sorvetes, recheios para bombons, licores e iogurtes, em vez de ser consumida in natura e também por apresentar pectina (com rendimento em torno de 7%) o torna adequado para preparar doces e geléias. Além disso, as sementes de *T. grandiflorum* têm recebido atenção devido ao seu potencial, essas sementes contêm importantes compostos bioativos, como ácido ascórbico e compostos fenólicos, ocasionando capacidade antioxidante, e se sobressaem como uma excelente alternativa para a obtenção de um produto em pó, para serem utilizadas como substitutos de chocolate após um processo de fermentação. (ROGEZ et al., 2004; CARVALHO; GARCÍA; FARFÁN, 2008; CHAVES et al., 2013; COSTA et al., 2015; ORNELLAS et al., 2017; POMBO et al., 2020; RAMOS et al., 2020).

Propriedades benéficas à saúde têm sido propostas para o cupuaçu, sua capacidade antioxidante é uma das mais estudadas. A polpa fresca apresenta uma atividade antioxidante considerável (1,7–2,0 μ MTrolox/g) superior, por exemplo, ao morango e semelhante a outras frutas nativas brasileiras como “araçá-boi” (*Eugenia stipitata* Mc. Vaugh) e jaracatiá (*Jaracatia spinosa* Aubl) (DIAS et al., 2019).

O cupuaçu tem sido considerado um alimento com potencial funcional, por ser rico em fibra alimentar, principalmente fibra solúvel em sua polpa, e ter uma quantidade considerável de amido e polissacarídeos de pectina, conferindo uma textura distinta das demais polpas de frutas, além de ser fonte de ácido ascórbico, compostos fenólicos e de compostos bioativos, que fazem com que esse alimento se destaque como uma fruta de alto valor nutricional (COSTA et al., 2015; PEREIRA et al., 2017; CURIMBABA et al., 2020).

2.3 Alimentos funcionais

A ciência dos alimentos funcionais é a convergência de dois eventos importantes em nossas vidas – dieta e saúde. A associação entre alimentos e doenças é amplamente reconhecida como a base da nutrição preventiva. A visão de desenvolver alimentos funcionais reflete a filosofia oriental de que: ‘Medicina e alimentação têm uma origem comum’ (HENRY, 2010).

A indústria de alimentos enfrenta vários desafios para atender às demandas de novos produtos alimentares que sejam seguros, agradáveis, saudáveis, nutritivos e sustentáveis. O crescimento considerável do interesse em saúde, alimentação e bem-estar levou a um aumento na demanda por alimentos com efeitos benéficos para a saúde. Essa demanda está ligada a um impulso para o desenvolvimento de alimentos funcionais que forneçam ingredientes que melhorem a saúde convenientemente (SILVA et al., 2020).

A European Commission Concerted Action a partir da Functional Food Science in Europe (FUFOSE) propôs uma definição de trabalho para alimento funcional: “um alimento que afeta benéficamente uma ou mais funções-alvo no corpo, além, efeitos nutricionais adequados de uma forma que seja relevante para uma melhoria do estado de saúde e bem-estar e/ou redução do risco de doenças. É consumido como parte de um padrão alimentar normal. Não é um comprimido, uma cápsula ou qualquer forma de suplemento dietético” (SILVA et al., 2020). Outro conceito, recentemente estudado, define alimentos funcionais como alimentos processados industrialmente ou naturais que, quando consumidos regularmente em uma dieta diversificada e em níveis eficazes, têm efeitos potencialmente positivos na saúde além da nutrição básica (GRANATO et al., 2020).

No Brasil, a ANVISA (2013) os define como aqueles que possuem propriedades, que estão relacionadas ao papel no crescimento, sejam fisiológicos ou metabólicos de um nutriente, ou não nutriente, ao desenvolvimento, manutenção, conservação e outras funções normais do organismo humano, sempre e quando seu consumo esteja associado a uma alimentação equilibrada e saudável. Os ingredientes permitidos pela ANVISA, com capacidade funcional

comprovada são: os carotenóides, os fitoesteróis, os flavonóides, os fosfolipídeos, os organossulfurados e os polifenóis; e probióticos (*Lactobacillus rhamnosus*, *Lactobacillus paracasei*, *Bifidobacterium animalis*, dentre outros) (ANVISA, 2013).

A funcionalidade desses alimentos deriva de ingredientes bioativos e depende de fatores tecnológicos. Além de seu valor nutricional como alimento convencional, esses ingredientes podem ajudar na prevenção de certos tipos de doenças ou na melhoria do desempenho e bem-estar dos consumidores, ajudam na promoção de condições ideais de saúde e podem reduzir os riscos de uma ou mais doenças não transmissíveis, como dislipidemia, câncer, diabetes tipo 2, AVC e doença cardiovascular (DCV) (GRANATO et al., 2020; SILVA et al., 2020).

Além da definição de alimentos funcionais, os principais critérios de inclusão para uma determinada alegação funcional de um ingrediente ou alimento em um rótulo alimentar são: acesso sem obrigação de receita médica (ou aconselhamento médico) e comprovação de benefícios à saúde quando consumido periodicamente em uma dieta equilibrada (GRANATO et al., 2020). Hoje os consumidores exigem alimentos que sejam produzidos e processados de forma sustentável, considerado seguros, frescos e naturais e tenham valor nutricional (GRANATO et al., 2020).

Leites fermentados, especialmente produtos do tipo iogurte, são as bebidas funcionais mais populares e até o momento, muitos dos estudos focados nos benefícios para a saúde da ingestão de alimentos fermentados têm se concentrado nesse alimento, cujo consumo está associado a melhores parâmetros metabólicos. Os produtos lácteos respondem por aproximadamente 43% do mercado de bebidas funcionais, sendo compostos principalmente por produtos fermentados. Também é intrigante notar que uma série de empresas de alimentos que têm estado sob pressão, devido à má percepção do público em relação à “saudabilidade” dos alimentos que produzem, está agora se concentrando no desenvolvimento de tais produtos funcionais (MARSH et al., 2014; TAYLOR et al., 2020).

Os mercados dos Estados Unidos, Europa e Japão respondem por mais de 90% do total de alimentos funcionais, sendo a maioria laticínios funcionais. No entanto, a distribuição de probióticos não lácteos tem atraído mais atenção nos últimos anos, em parte devido ao sucesso dos alimentos biofuncionais e ao desejo de expandir e fornecer uma escolha probiótica alternativa às bebidas lácteas convencionais. As bebidas probióticas não lácteas são especialmente interessantes por ser uma opção atraente para os consumidores que são intolerantes à lactose, alérgicos ao leite ou que o evitam por qualquer outro motivo, baixo teor de colesterol e status vegano. As novas características dos produtos e dos substratos não convencionais com respeito à tecnologia dos probióticos são o foco dos mercados de alimentos

funcionais, o qual procura soluções para os problemas de estabilidade e viabilidade dos probióticos em novos substratos e/ou meios como frutas, sementes, entre outros. Além disso, diferentes substratos não convencionais podem fornecer diferentes combinações de antioxidantes, fibra alimentar, minerais e vitaminas (VILLEGAS; CARBONELL; COSTELL, 2008; MARSH et al., 2014; HERNÁNDEZ-TORRES, 2019).

2.4 Prebióticos, probióticos e simbióticos

Um grave problema está afetando a população mundial moderna hoje em dia, a ocorrência de doenças crônicas, tais como: câncer, diabetes, doenças respiratórias crônicas e doenças cardiovasculares, que estão associadas principalmente ao estilo de vida da população, incluindo alimentação e atividade física. A etiologia dessas doenças é complexa, e a prevenção está principalmente alusiva a costumes de longo prazo, como a adoção a modelos alimentares saudáveis. Portanto, a fim de ajudar as pessoas a ter acesso a alimentos industrializados mais saudáveis, os cientistas que trabalham com ciência e tecnologia de alimentos têm desenvolvido novas tecnologias para produzir esses alimentos (GUIMARÃES et al., 2019).

Alimentos funcionais podem ajudar no combate às doenças crônicas, que podem ser descritas como alimentos com benefícios para a saúde (GUIMARÃES et al., 2019). Diversos estudos apresentam evidências admissíveis de inúmeros mecanismos subjacentes aos efeitos de promoção da saúde das células bacterianas intestinais desejáveis; estes compreendem modificações da microbiota intestinal, adesão competitiva à mucosa e epitélio, melhora da função de barreira do revestimento epitelial e modulação do sistema imunológico. As bactérias intestinais dependem totalmente de seu hospedeiro para fornecer os nutrientes necessários que podem promover o crescimento da microbiota. No entanto, as bactérias produzem metabólitos de baixa massa molecular durante seu ciclo de vida; esses compostos desempenham um papel fundamental na regulação do auto crescimento, desenvolvimento e reprodução, estimulam o crescimento de outros organismos benéficos, comunicação célula a célula e proteção contra fatores de estresse (AGUILAR-TOALÁ et al., 2018).

Algumas das propriedades funcionais são observadas em alimentos com características probióticas e prebióticas e o desenvolvimento de muitos produtos funcionais é baseado nesses ingredientes, que apresentam efeitos funcionais, melhora do funcionamento do intestino, melhora do sistema imunológico, ajuda na prevenção da carcinogênese, doenças cardíacas, osteoporose e efeitos benéficos no metabolismo da glicose e dos lipídios (GUIMARÃES et al., 2019; MONDRAGÓN-BERNAL; MAUGERI, 2008).

Prebióticos são conceitualizados como carboidratos não-digeríveis que promovem o crescimento e/ou a atividade de um grupo de bactérias no cólon, promovendo benefícios à saúde do indivíduo. Para desempenhar essas atividades, alguns atributos são indispensáveis: resistir à acidez gástrica, à hidrólise por enzimas intestinais e não serem absorvidos pelo aparelho digestório (carboidratos não-digeríveis). Desta maneira, podem ser usufruídos como substrato para a microbiota intestinal, incentivando seletivamente a proliferação de bactérias que auxiliam para o bem-estar e saúde do hospedeiro (SOUZA et al., 2010). A definição pelo Encontro Técnico de Prebióticos promovido pela FAO, descreve os prebióticos como componentes alimentares não viáveis que conferem benefícios à saúde dos hospedeiros associados à modulação de sua microbiota intestinal (MONDRAGÓN-BERNAL et al., 2017).

O aumento do vegetarianismo e a preocupação do consumidor a uma dieta alternativa aos produtos lácteos probióticos de alto valor nutricional e isentos de colesterol e lactose é de grande interesse para os pesquisadores. Como resultado disso, novas matrizes alimentares como portadoras de probióticos são cada vez mais estudadas. Sucos de frutas inoculados com microrganismos probióticos apresentaram resultados promissores (PEREIRA et al., 2017).

Houve grande progresso no desenvolvimento dos chamados produtos probióticos, suplementos alimentares contendo microrganismos vivos capazes de atingir o intestino e modificar a composição da microbiota, que, quando administradas em quantidades adequadas, conferem benefício à saúde do hospedeiro (SOUZA et al., 2010; MONDRAGÓN-BERNAL et al., 2017; STIEMSMA et al., 2020).

Esses efeitos estão direta e particularmente associados ao modelo da cepa utilizada. Para ser adotado como probiótico, a bactéria necessita possuir identificação internacionalmente conhecida (espécie e subespécie da cepa); ser resistente à acidez gástrica e à ação dos sais biliares; proporcionar efeitos benéficos ao hospedeiro, demonstrados *in vivo* e *in vitro*, por meio de uma dose determinada; ter potencial adesão ao muco ou epitélio intestinal; demonstrar segurança comprovada (baixo risco de infecção sistêmica e de criação de toxinas deletérias, não apresentar estímulo demasiado à resposta imunológica e não proporcionar a transferência de genes entre micro-organismos) e assegurar a garantia da estabilidade da viabilidade até o momento da ingestão, seja na forma de cápsula, pó ou adicionada a produtos lácteos ou não lácteos (SOUZA et al., 2010).

Os microrganismos probióticos mais comuns, usados e comercializados em alimentos em todo o mundo, pertencem aos gêneros *Lactobacillus* e *Bifidobacterium*. Em sucos de frutas, os *Lactobacillus* têm demonstrado maior resistência ao ácido quando comparados às *Bifidobacterium* (PEREIRA et al., 2017).

É sabido, que o alimento pode influenciar o crescimento, a viabilidade e a sobrevivência, a tolerância ao ácido e bile e as diferentes funcionalidades dos probióticos que determinam sua eficácia no intestino. Portanto, a investigação cuidadosa da interação de diferentes probióticos e componentes dos alimentos devem ser consideradas no desenvolvimento de alimentos probióticos funcionais (PEREIRA et al., 2017).

As bactérias do gênero *Lactobacillus* atuam no intestino delgado, enquanto o grupo bifidogênico atua no intestino grosso, notadamente na região do cólon. A reintrodução desses grupos microbianos no hospedeiro é feita por meio da administração de espécies selecionadas, que devem estar em números elevados e viáveis no momento do consumo (MONDRAGÓN-BERNAL; MAUGERI, 2008).

Para que os microrganismos probióticos sejam eficientes, eles devem ser rigorosamente selecionados, pois haverá várias barreiras a serem superadas até o local onde deverão atuar. Um probiótico de amplo espectro deve conter microrganismos que atuarão em todo o intestino. Para exercer efeitos probióticos, essas bactérias devem conseguir aderir à superfície da mucosa intestinal (GUARNER, 2007; MONDRAGÓN-BERNAL; MAUGERI, 2008; WGO, 2017).

As funções tanto dos probióticos quanto dos prebióticos estão entrelaçadas com os microrganismos que colonizam os seres humanos. Os prebióticos servem como fonte de alimento para os membros benéficos da comunidade bacteriana comensal. A interação entre probióticos e células anfitriãs, ou entre probióticos e microrganismos autóctones, oferece um meio fundamental para influenciar na saúde do hospedeiro (GUARNER et al, 2017).

A influência positiva de substâncias prebióticas, consideradas fibras solúveis, na microbiota intestinal foi testada em vários estudos, onde a utilização de espécies probióticas em combinação com substâncias prebióticas fornecem um efeito combinado denominado “simbiótico”. Na interação simbiótica é necessária a seleção de linhagens de microrganismos com melhor capacidade de utilização de um determinado prebiótico, para se obter um efeito sinérgico na implantação e proliferação das bactérias desejáveis. Então, alimentos funcionais simbióticos são aqueles que fornecem prebióticos e probióticos e seus efeitos sinérgicos (MONDRAGÓN-BERNAL et al., 2017; SOUZA et al., 2010; STIEMSMA et al., 2020).

Um produto referido como simbiótico é aquele no qual um probiótico e um prebiótico estão combinados. De acordo com a WGO (2017), simbióticos são produtos que contêm tanto probióticos como prebióticos, que conferem benefícios à saúde, no geral, são que as propriedades dos prebióticos podem influenciar o crescimento e a sobrevivência dos probióticos, afetando o crescimento dos probióticos e das culturas iniciais na totalidade. Isso leva a considerar as interações entre probióticos e iniciadores. A interação entre o probiótico e

o probiótico *in vivo* pode ser favorecida por uma adaptação do probiótico ao substrato prebiótico anterior ao consumo. Isto pode, em alguns casos, resultar em uma vantagem competitiva para o probiótico, se ele for consumido juntamente com o prebiótico. Alternativamente, esse efeito simbiótico pode ser direcionado às diferentes regiões “alvo” do trato gastrointestinal, os intestinos delgado e grosso. O consumo de probióticos e de prebióticos selecionados apropriadamente pode aumentar os efeitos benéficos de cada um deles, uma vez que o estímulo de cepas probióticas conhecidas leva à escolha dos pares simbióticos substrato-microrganismo ideais (MONDRAGÓN-BERNAL; MAUGERI, 2008; SAAD, 2006).

Um produto funcional deve conter entre 10^6 e 10^8 unidades formadoras de colônias por grama (UFC/g) para efeitos terapêuticos ideais (ANVISA, 2011); no entanto, várias legislações internacionais recomendam uma população de probióticos mínima variando de 10^8 a 10^9 UFC/porção diária de o produto alimentar (OLIVEIRA et al, 2011). Em relação aos alimentos que contenham fibras comestíveis, podem ser acrescentadas as seguintes declarações nutricionais: “fonte de fibras”, quando o teor for mínimo de 3,0 g/100 g ou 100 mL, ou, “alto conteúdo de fibra”, quando contiver mínimo de 6,0g/100 g ou 100 mL (ANVISA, 2012).

2.4.1 *Lactobacillus*, *Bifidobacterium* e *Saccharomyces boulardii*

A grande maioria das culturas probióticas é originária do intestino saudável humano ou animal, estas culturas são capazes de compor a microbiota do hospedeiro após consumidas mesmo que temporariamente. Pode-se afirmar que uma linhagem probiótica irá desempenhar melhor seu efeito benéfico quando estiver em ambiente similar ao qual foi isolado, visto que é hospedeiro-específica, desta maneira é aconselhável que os microrganismos probióticos para o consumo humano sejam de origem humana. Uma exceção é a levedura *Saccharomyces boulardii* que, embora não sendo de origem humana ou animal, é reconhecida como probiótica e empregada na indústria farmacêutica (ANTUNES et al., 2007).

A *Saccharomyces boulardii* é uma levedura da linhagem da *S. cerevisiae*, essa linhagem foi originalmente isolada a partir de frutas na Indochina, a partir da fruta tropical lichia, e tem sido utilizada para o tratamento de doenças intestinais em crianças e adultos desde 1950. Sua ação é baseada em múltiplos mecanismos, incluindo o estímulo do sistema imunológico; efeito anti-inflamatório e antissecretório; efeito prebiótico, estimulando a regeneração e estabelecimento da microbiota saudável; proteção contra os patógenos e suas toxinas e regeneração das células do epitélio intestinal (NASCIMENTO et al., 2018).

Esta levedura, não patogênica e termotolerante, apresentam crescimento ótimo a 37°C (PAIS et al., 2020), e é resistente à ação do suco gástrico, das secreções entéricas e pancreáticas e da bile, assim como à ação de antibióticos e quimioterápicos. Além dessas características, *S. boulardii* protege contra microrganismos patogênicos e não é tóxica, razões pelas quais é caracterizada como um microrganismo, com efeito, probiótico (LOPES; PINTO, 2010).

O efeito prebiótico da *S. boulardii* é devido à composição de sua parede celular, composta por glucanos e manoproteínas, que servem como excelente substrato para o metabolismo microbiano, levando à produção de compostos benéficos, como o butirato (NASCIMENTO et al., 2018).

As culturas mais empregadas como probióticas pertencem aos gêneros *Lactobacillus* e *Bifidobacterium* e suas características principais estão descritas a seguir:

a) Gênero *Lactobacillus*

Este gênero é amplamente distribuído no meio ambiente, especialmente em alimentos vegetais, no aparelho digestório e genital. A sua ocorrência é influenciada por diversos fatores ambientais, tais como pH, presença de oxigênio, presença de fatores específicos e interações com outras bactérias. Os lactobacilos são bastonetes, gram-positivos, não formadores de esporos, não flagelados, aeróbios ou anaeróbios facultativos, que se dispõem em forma de cadeias diferentes tamanhos. São estritamente fermentativos, acumulando ácido lático no meio como produto do metabolismo primário. Eles raramente apresentam patogenicidade. O seu pH ótimo de crescimento situa-se na faixa de 5,5 e 6,3 e possuem faixa ótima de temperatura entre 30-40°C (ANTUNES et al., 2007).

b) Gênero *Bifidobacterium*

As bifidobactérias são habitantes naturais do intestino humano e animal, são bastonetes, gram-positivas, não formadoras de esporos, desprovidas de flagelos, anaeróbios, no entanto, algumas são tolerantes ao oxigênio. Frequentemente apresentam formato de “Y”, conhecido como forma “bífida” e requerem nutrientes especiais, dificultando seu isolamento e crescimento em laboratórios. A faixa ideal de temperatura de crescimento situa-se entre 20 °C a 46 °C e morrem a 60 °C. Seu pH ótimo é 6,5-7,0, não havendo crescimento em pH<5,1 ou pH>8,0. O aparelho digestório de um recém-nascido é rapidamente colonizado por bactérias oriundas da vagina durante o parto. Após um mês, a microbiota no intestino do bebê será ocupada por 80% de bifidobactérias e essa população parece ser relativamente estável até idade adulta, quando começa seu declínio, com o decorrer dos anos de vida, a população intestinal de bifidobactérias

tende a diminuir gradativamente, representando 20% das bactérias entéricas. Idosos tendem a apresentar populações ainda menores de bifidobactérias, enquanto o número de bactérias patogênicas - tais como coliformes, enterobactérias e clostrídios – e leveduras tende a aumentar, conseqüentemente, ocorre aumento da susceptibilidade às infecções gastrintestinais. Sua população é influenciada pela dieta, antibióticos, estresse e etc (ANTUNES et al., 2007).

Segundo Tamime et al. (1995), essas bactérias crescem em meios que contêm triptose, fitona (peptona de soja), extrato de levedura, agrupam-se em colônias com forma de disco voador com bordas bem definidas; as células apresentam epitélio específico: em *B. breve* é mais fino e curto; muito alongado, relativamente fino, com irregularidades pequenas no contorno e algumas pintas em *B. longum*; e, *B. adolescentis infantis* apresentam morfologia muito semelhante à maioria das espécies de bifidobactérias.

Bifidobactérias não são bactérias ácidas lácticas “verdadeiras” como *Lactococcus* ou *Pediococcus*, produzem tanto o ácido acético quanto o ácido láctico por uma via incomum, não usual do sistema metabólico da glicose, resultante em uma proporção teórica de 3:2 (acetato/lactato) como metabólitos primários. Em adição, pequenas quantidades de ácido fórmico e etanol são frequentemente produzidos (BARBOSA et al., 2011).

A incorporação de bifidobactéria na cadeia de alimentos pode ser difícil, porque, usualmente, exibe um crescimento fraco em leite e requer um ambiente anaeróbio, baixo potencial de óxido-redução e a adição de fatores bifidogênicos para obter os níveis de crescimento desejados (MONDRAGÓN-BERNAL et al., 2017).

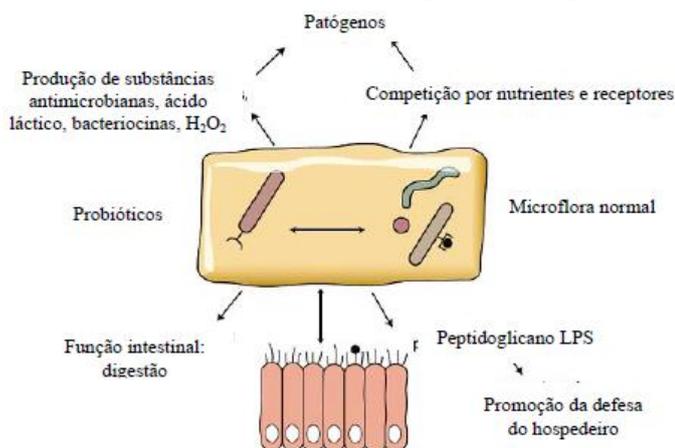
A sobrevivência da bactéria probiótica no meio de fermentação, depende das cepas usadas, interação entre espécies presentes, condições de cultivo, composição química do meio (p.e. fonte de carbono), acidez final, conteúdo de sólidos, promotores e inibidores do crescimento, concentração de açúcares (pressão osmótica), oxigênio dissolvido (especialmente para bifidobactérias), nível de inoculação, temperatura de incubação, tempo de fermentação e temperatura de estocagem (MAUGERI FILHO et al., 2016).

2.4.2 Mecanismos de ação dos probióticos

Os prebióticos afetam as bactérias intestinais, aumentando o número de bactérias anaeróbias benéficas e diminuindo a população de microrganismos potencialmente patogênicos. Os probióticos afetam o ecossistema intestinal estimulando os mecanismos imunes da mucosa, interagindo com microrganismos comensais ou potencialmente patogênicos, gerando produtos metabólicos finais, como ácidos graxos de cadeia curta, e se comunicando

com as células do hospedeiro através de sinais químicos (Figura 1.3) (GUARNER et al., 2017). A Tabela 1.3 ilustra os principais efeitos benéficos e terapêuticos atribuídos ao consumo de probióticos e a Tabela 1.4 os mecanismos de interação entre probióticos, prebióticos e hospedeiro.

Figura 1.3 - Mecanismos de interação entre microbiota, probióticos e hospedeiro. A microbiota normal e os probióticos interagem com o hospedeiro em atividades metabólicas e funções imunes e evitam a colonização de microrganismos oportunistas e patogênicos.



Fonte: Guarner et al. (2017)

A tolerância dos probióticos a pHs ácidos e enzimas presentes no aparelho digestório humano, produção de componentes antimicrobianos e adesão na mucosa intestinal caracterizam a sua funcionalidade, estes mecanismos podem conduzir ao antagonismo de patógenos potenciais, a melhorar o ambiente intestinal, fortalecer a barreira intestinal, à regulação negativa da inflamação e à regulação positiva da resposta imune a desafios antigênicos. Estima-se que esses fenômenos conduzem a efeitos benéficos, inclusive redução da incidência e gravidade da diarreia (GUARNER et al., 2017). Para que uma bactéria seja probiótica, ela deve atender a certos requisitos, como os listados na Tabela 1.3.

Os probióticos podem estimular a resposta da imunidade inata contra patogênicos. As células dendríticas intestinais podem reter bactérias convivas, ativando seletivamente os linfócitos B a produzir IgA e diminuir a penetração da mucosa por bactérias indesejáveis. O probiótico estimula a produção de substâncias e componentes citoprotetores nas células humanas, bloqueando a indução de apoptose, contribuindo na restituição da barreira epitelial danificada (SARKAR; MANDAL, 2016). O mecanismo de isenção competitiva se baseia na capacidade do probiótico de bloquear as ligações entre os receptores das células epiteliais com as adesinas dos microrganismos patogênicos, impedindo a aderência dos mesmos. Para conseguir bloquear essas ligações, os probióticos produzem componentes antimicrobianos como são

ácidos lácticos, peróxido de hidrogênio, ácido acético, e bacteriocinas (JENSEN et al., 2012; MONTEAGUDO-MERA et al., 2012; SARKAR E MANDAL, 2016). Além da proteção competitiva dos probióticos, a microbiota anaeróbia nativa do aparelho digestório limita a concentração de patógenos (SOCCOL et al., 2010).

Tabela 1.3 - Efeitos benéficos e aplicações terapêuticas atribuídos a bactérias probióticas em humanos. Alguns critérios de seleção para microrganismos probióticos.

Efeitos benéficos	Alguns critérios para a seleção de microrganismos probióticos
Manutenção da microbiota intestinal normal.	Origem humana.
Antagonista de crescimento de agentes patogênicos.	Resistência ao suco gástrico.
Estimulação do sistema imunológico.	Capacidade de aderir à mucosa intestinal.
Redução da intolerância à lactose.	Resistência biliar.
Redução dos níveis de colesterol.	Resistência à lisozima.
Impedimento da reabsorção de compostos amino indesejáveis.	Persistência no aparelho digestório humano.
Redução em doenças coronárias.	Produção de substâncias antimicrobianas.
Atividade antimutagênica.	Antagonistas de bactérias patogênicas e carcinogênicas.
Atividade antitumorogênica.	Seguro para uso clínico e alimentar.
Melhoria do valor nutricional dos alimentos.	Alto número de microrganismos probióticos, no momento do consumo, tendo que resistir às condições de processamento (desidratação, congelamento, liofilização).
Efeitos nutricionais.	Validação clínica e documentação dos efeitos na saúde.
Aplicações terapêuticas	
Prevenção de infecção urogenital.	
Alívio da constipação.	
Proteção contra diarreia de viajantes.	
Prevenção da diarreia infantil.	
Prevenção da diarreia induzida por antibióticos.	
Prevenção da hipocolerimemia.	
Prevenção do câncer de cólon e bexiga.	
Prevenção da osteoporose.	
Fonte: Fuller (1989); Martin (1996); de Fooks; Fuller; Gibson (1999); Saarela et al. (2000); Lourens-Hattingh; Viljoen (2001); adaptado por Mondragón-Bernal; Maugeri (2008).	

Tabela 1.4 - Mecanismos de interação entre probióticos, prebióticos e hospedeiro. A simbiose entre microbiota e hospedeiro pode ser otimizada com intervenções farmacológicas ou nutricionais no ecossistema microbiano intestinal usando probióticos ou prebióticos.

Probióticos	
Benefícios imunológicos	Ativar os macrófagos locais para aumentar a apresentação dos antígenos para os linfócitos B e aumentar a produção de imunoglobulina A secretória (IgA) tanto local quanto sistemicamente. Modular os perfis das citocinas. Induzir tolerância aos antígenos alimentares.
Benefícios não imunológicos	Digerir os alimentos e competir com os patógenos pelos nutrientes. Alterar o pH local para criar um ambiente local desfavorável para os patógenos. Produzir bacteriocinas para inibir os patógenos. Fagocitar os radicais superóxidos. Estimular a produção epitelial de mucina. Aumentar a função da barreira intestinal. Competir pela adesão com os patógenos. Alterar as toxinas de origem patogênica.

Prebióticos

Efeitos metabólicos: produção de ácidos graxos de cadeia curta, absorção de íons (Ca, Fe, Mg)
Aumentar a imunidade do hospedeiro (produção de IgA, modulação de citocinas, etc.)

Fonte: Guarner et al. (2017)

2.4.3 Uso de probióticos em fermentações de suco de frutas

Estudos com sucos de frutas evidenciaram o aumento da capacidade antioxidante ao longo da fermentação com microrganismos probióticos. Segundo PEREIRA et al., 2017, que avaliaram o comportamento de condições de cultivo de *Lactobacillus casei* na bebida de cupuaçu, onde as amostras foram inoculadas 7,00 logUFC/mL, e após 24 horas observaram-se superiores a 8,00 logUFC/mL, indicando que o cupuaçu é uma boa matriz para a produção da bebida probiótica, uma vez que não foi observada perda de viabilidade no processo de fermentação em todos os ensaios realizados.

Além disso, informam que a produção da bebida probiótica de cupuaçu mostrou-se vantajosa devido ao crescimento microbiano mais rápido, em comparação com outras frutas estudadas. DIMITROVSKI et al., 2015 produziram suco de maçã fermentado com *Lactobacillus plantarum*, esses autores relataram viabilidade de 8,51 Log UFC/mL após 24 h de fermentação a 37°C. Enquanto PEREIRA et al., 2017, relaram o tempo necessário para atingir a mesma viabilidade para o cupuaçu foi menor, em torno de 8 h, e a viabilidade celular aumentou até 18 h de fermentação atingindo > 9 Log UFC/mL, assim exigindo menores períodos de fermentação. FONTELES et al., 2013, que estudam a estabilidade e qualidade do suco probiótico de melão cantaloupe, mostram que a *L. casei* conseguiu fermentar o suco de melão cantaloupe com boa taxa de crescimento e viabilidade usando apenas os açúcares naturalmente presentes no suco, sem a necessidade de adição de sacarose ou outros nutrientes, atingindo 8,25 log UFC/mL as 8h de fermentação.

Outro benefício identificado na utilização do cupuaçu, de acordo com PEREIRA et al., 2017, é que o pH caiu ao longo da fermentação, atingindo o valor de pH de $4,30 \pm 0,01$ após 18h, devido ao aumento da concentração de ácido láctico. O ácido láctico é reconhecido como o principal metabólito das bactérias lácticas e a acidificação é um dos efeitos mais desejáveis de seu crescimento. O pH abaixo de 4,5, é baixo o suficiente para inibir o crescimento de patógenos e muitos microrganismos espoliadores. FONTELES et al., 2013, demonstram quedas também do pH no estudo de suco probiótico de melão cantaloupe, atingindo cerca de $3,9 \pm 0,01$ às 12h.

No estudo de PEREIRA et al., (2017), valores de ácido láctico foram de $6,44 \pm 0,00$ g/L obtidos em 20h de fermentação. Assim, a bebida de cupuaçu mostrou-se um bom substrato para o crescimento de *L. casei*, apresentando produção de ácido láctico mais rápida do que o meio

MRS, modelo estudado por VODNAR et al., (2010) que ao examinaram a capacidade de *L. casei* em produzir ácido láctico no modelo durante a fermentação (37°C, 78h), obtiveram 6,16 g/L de ácido láctico. E o cupuaçu apresenta uma maior produção de ácido láctico em comparado com o suco probiótico de melão cantaloupe fermentado por *L. casei*, estudado por FONTELES et al. (2013), que apresentaram valores em torno de 3,0 g/L.

Além disso, o cupuaçu contém importantes compostos bioativos como o ácido ascórbico, esse bioativo é associado à boa sobrevivência das bactérias lácticas na fermentação, indicando que bebida de cupuaçu se mostrou mais vantajosa para a produção de probióticos devido à presença natural desse ácido (PEREIRA et al., 2017). Outro dado importante, é a elevação da atividade antioxidante no decorrer das 18h de fermentação, que passou de 0,53 para 0,66 μM Trolox/mL, representando um aumento em torno de 24,5%. Tendo em vista que as atividades antioxidantes contribuem na proteção do organismo humano, auxiliando contra o estresse oxidativo, impedindo e prevenindo uma série de distúrbios crônico-degenerativos (CANUTO et al., 2010; PEREIRA et al., 2017).

2.5 Paraprobióticos e pós-bióticos

Conforme já definido, um probiótico deve ser viável, e é importante notar que mecanismos subjacentes aos efeitos de promoção da saúde das células bacterianas intestinais desejáveis são claramente dependentes do estado de viabilidade das bactérias; portanto, não é aplicável a células bacterianas mortas ou componentes celulares. No entanto, evidências recentes sugerem que a viabilidade bacteriana não é necessária para atingir os efeitos de promoção da saúde, e devido a essas novas evidências, termos como paraprobiótico e pós-biótico foram instituídos para apresentar os benefícios para a saúde além da viabilidade específica dos probióticos, fornecendo uma ampla dimensão ao termo de probióticos. Esses termos, embora tenham surgido recentemente, têm sido adotados rapidamente na área de ciência e tecnologia de alimentos, bem como em saúde humana e nutrição, resultando em um interesse especial por suas potenciais aplicações como alimentos funcionais, nutracêuticos e medicamentos em alimentos, biotecnológica e indústria farmacêutica. No entanto, alguns aspectos relacionados às bioatividades e aos efeitos promotores da saúde dos paraprobióticos e pós-bióticos situam-se ainda ignorados ou inexplorados (AGUILAR-TOALÁ et al., 2018; CUEVAS-GONZÁLEZ; LICEAGA; AGUILAR-TOALÁ, 2020).

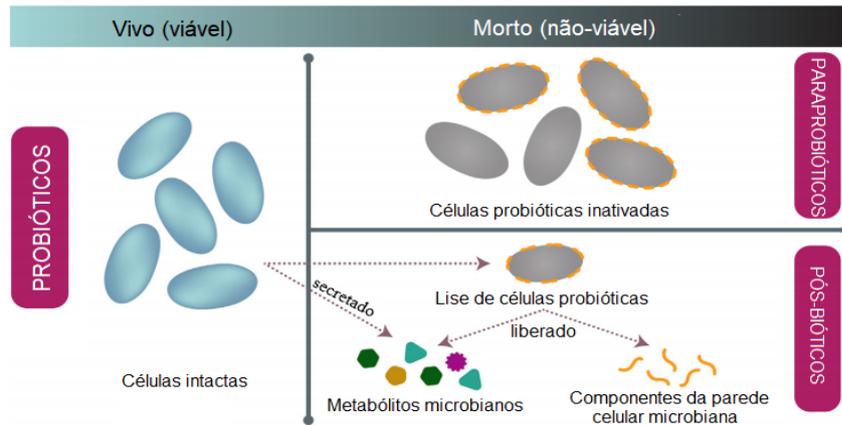
O conhecimento atual permite afirmar que a viabilidade bacteriana não é necessária para se atingir todos os efeitos probióticos, pois nem todos os mecanismos, nem benefícios clínicos

estão diretamente relacionados à viabilidade das bactérias. Isso foi demonstrado recentemente, uma vez que algumas pesquisas compararam microrganismos viáveis ou inativados e diferentes frações microbianas obtidas a partir deles (AGUILAR-TOALÁ et al., 2018; CUEVAS-GONZÁLEZ; LICEAGA; AGUILAR-TOALÁ, 2020).

É importante diferenciar os conceitos de pós-biótico e de paraprobióticos, delimitando sua definição (Figura 1.4). Os pós-bióticos, também conhecido como metabióticos, biogênicos ou metabólitos e/ou sobrenadantes/extratos livres de células, são fatores solúveis (produtos ou subprodutos metabólicos) secretados por bactérias vivas (ou seja, probióticos ou não probióticos) ou liberados após a lise bacteriana que podem oferecer efeito positivo ao hospedeiro, fornecendo bioatividade adicional (AGUILAR-TOALÁ et al., 2018; CUEVAS-GONZÁLEZ; LICEAGA; AGUILAR-TOALÁ, 2020).

Em contrapartida, os paraprobióticos são células microbianas (probióticas ou não probióticas) inativadas (não viáveis) intactas, que quando administradas em quantidades suficientes conferem benefícios aos consumidores. Semelhantemente, os paraprobióticos são intitulados como probióticos não viáveis, probióticos inativados ou probióticos fantasmas. Em vista disso, os paraprobióticos e os pós-bióticos representam novas categorias de agentes modificadores de respostas biológicas (CUEVAS-GONZÁLEZ; LICEAGA; AGUILAR-TOALÁ, 2020). Apesar dos benefícios comprovados dos probióticos para a saúde, as células microbianas inviáveis podem ter vantagens de segurança sobre os probióticos, reduzindo o risco de translocação microbiana, infecção ou respostas inflamatórias aumentadas, demonstrado para alguns probióticos em consumidores com sistema imunológico desequilibrado ou comprometido. Uma vez as células bacterianas inativadas, seja por métodos físicos (interrupção mecânica, tratamento térmico, irradiação γ - ou UV, alta pressão hidrostática, liofilização, sonicação) ou químicos (desativação ácida), assim alterando as estruturas celulares microbianas ou suas funções fisiológicas; então, as bactérias ficam impossibilitadas de se desenvolver e, por consequência, conservam os efeitos benéficos para a saúde que a sua forma viável oferece (AGUILAR-TOALÁ et al., 2018).

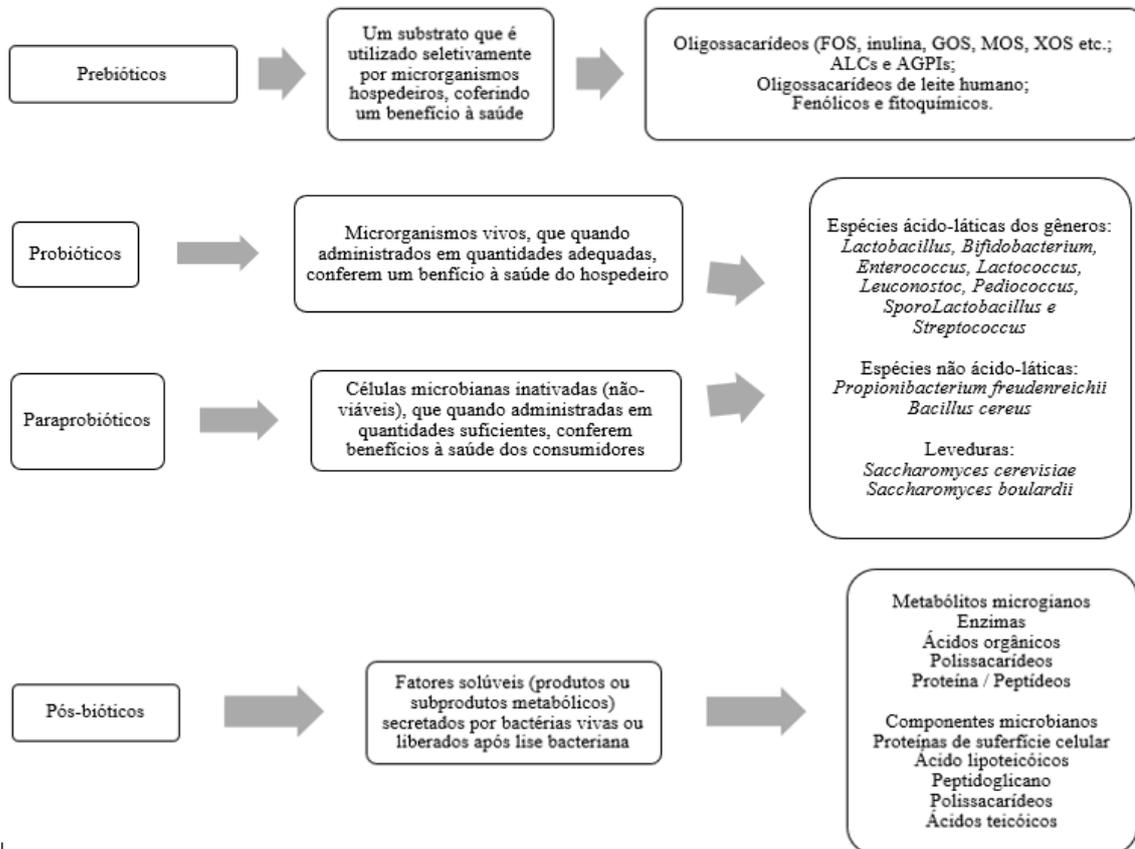
Figura 1.4 - Conceitualização dos termos paraprobióticos e pós-bióticos.



Fonte: Cuevas-González; Liceaga; Aguilar-Toalá (2020)

De uma maneira simplificada, a Figura 1.5 apresenta a definição e os agentes de probióticos, prebióticos, paraprobióticos e pós-bióticos.

Figura 1.5 - Prebiótico, probiótico, paraprobiótico e pós-biótico. ALC, ácido linoleico conjugado; AGPI, ácido graxo poliinsaturado; FOS, frutooligossacarídeos; GOS, galacto-oligossacarídeos; MOS, mananoligossacarídeo; XOS, xilooligossacarídeo.



Fonte: Guimarães et al. (2019); Sturmer et al. (2012).

Nos últimos anos, um número considerável de estudos usando modelos *in vitro* (por exemplo, diversas linhagens celulares em soluções simulando o sistema digestório) e *in vivo* (por exemplo, ratos obesos e hipertensos) foi usado para avaliar a bioatividade potencial e/ou os efeitos na saúde de vários pós-bióticos, incluindo metabólitos intracelulares e componentes da parede celular, seja como estruturas isoladas ou misturas, como extratos ou suspensões (AGUILAR-TOALÁ et al., 2018).

Está comprovado que a suplementação com pós-bióticos reduz a pressão arterial, conferindo capacidade anti-hipertensiva a esses compostos. O mecanismo desse resultado benéfico pode ser devido às mudanças na microbiota intestinal e seus subprodutos metabólicos; a restauração da função de barreira intestinal; e os efeitos na endotoxemia, inflamação e atividade do nervo simpático renal. Estudos mostram que a microbiota intestinal também afeta uma ampla gama de funções no aparelho digestório, incluindo o desenvolvimento do sistema imunológico, defesa contra patógenos e inflamação (AGUILAR-TOALÁ et al., 2018).

Os pós-bióticos também foram descritos como inibidores de bactérias patogênicas, como *Listeria monocytogenes* L-MS, *Salmonella enterica* S-1000, *Escherichia coli* E-30 e *Enterococci*. Além disso, a atividade antioxidante em modelos *in vitro* e *in vivo* expostos a exopolissacarídeos (EPS) específicos foi relatada. Além disso, os pós-bióticos também podem ser produzidos pela atividade metabólica das leveduras. Os sobrenadantes de cultura, obtidos de *Saccharomyces boulardii*, melhoraram a capacidade de cicatrização de feridas e a migração de células epiteliais por meio da ativação de receptores de colágeno integrina $\alpha 2\beta 1$ usando modelos *in vitro*. Os dados sugerem que esses sobrenadantes poderiam melhorar o processo de reparo do epitélio intestinal após dano (restituição intestinal) e possuem aplicações terapêuticas potenciais em uma ampla variedade de distúrbios gastrointestinais (AGUILAR-TOALÁ et al., 2018).

2.6 Avaliação de probióticos para uso em alimentos

No Brasil, o uso de probióticos em alimentos requer prévia avaliação da ANVISA, segundo requisitos da Resolução RDC Anvisa nº 241, de 27 de julho de 2018. A avaliação efetuada contempla três elementos principais: comprovação inequívoca da identidade da linhagem do micro-organismo, de sua segurança e de seu efeito benéfico (ANVISA, 2019).

Quanto à oferta de alimentos com alegação de propriedade funcional ao consumidor, implica-se no âmbito da propaganda de alimentos que os produtos comercializados devem obedecer obrigatoriamente aos critérios estabelecidos pela RDC nº 2, de 7 de janeiro de 2002.

Essa legislação visa principal “padronizar os procedimentos a serem adotados para a avaliação de segurança, registro e comercialização de Substâncias Bioativas e Probióticos Isolados com alegação de propriedades funcional e/ou de saúde”, e indica que no caso dos Probióticos, deve constar a quantidade dos microrganismos viáveis, que garanta a ação alegada no prazo de validade do produto. Esta informação deve estar próxima à alegação de propriedade funcional e/ou de saúde do produto e fora da Tabela de Informação Nutricional (SILVA FILHO et al., 2018).

Segundo o Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade de Bebida Láctea da Instrução Normativa MAPA nº 16 de 23/08/2005, estabelece que a contagem total de bactérias lácticas viáveis deve ser no mínimo de 10^6 UFC/g, no produto final, para o(s) cultivo(s) láctico(s) específico(s) empregado(s), durante todo o prazo de validade (MAPA, 2005). Para a bebida fermentada ser considerada um produto probiótico é necessário que as bactérias probióticas sobrevivam no produto durante sua vida de prateleira (MONDRAGÓN-BERNAL, 2004). A legislação brasileira recomenda uma população mínima de probióticos de 10^8 a 10^9 UFC em uma porção diária de alimento para que o mesmo possa exercer efeitos benéficos à saúde (ANVISA, 2008). Para garantir um efeito contínuo no organismo humano, os probióticos devem ser ingeridos diariamente. Alterações favoráveis na composição da microbiota intestinal, capazes de garantir a manutenção das concentrações ativas fisiologicamente (quantidade intestinal de 10^6 a 10^7 UFC.g⁻¹) *in vivo*, foram observadas com doses de 100 g de produto alimentício contendo 10^8 a 10^9 unidades formadoras de colônias (UFC) de microrganismos probióticos (OLIVEIRA et al., 2019; PEREIRA e LUSNE., 2019).

2.7 Resistência de probióticos ao aparelho digestório e adesão às superfícies mucosas

O primeiro passo na produção de uma cultura probiótica para sua implementação em larga escala passa pelo seu desenvolvimento em meio de cultura adequado para a produção de biomassa. Nesse sentido, as variáveis envolvidas durante o crescimento da cepa (pH do meio, tipo e concentração de carboidratos, fase de crescimento na colheita, estado fisiológico celular, etc.) podem afetar significativamente tanto sua resistência às barreiras biológicas (acidez gástrica e sais biliares) e sua capacidade de interagir com as células do sistema imunológico, condicionando sua funcionalidade (VINDEROLA et al., 2011).

A funcionalidade dos probióticos é caracterizada pela tolerância à pHs ácidos e enzimas pancreáticas presentes no aparelho digestório, adesão na mucosa intestinal, produção de componentes antimicrobianos e resistência a certos antibióticos. Para promover efeitos

benéficos à saúde, é essencial que os probióticos consigam sobreviver a passagem através do estômago, e atinjam o intestino em quantidades adequadas de células viáveis, conseguindo multiplicar no hospedeiro (ECKERT, 2016).

Desta forma, a sobrevivência de bactérias no aparelho digestório depende, inicialmente, da sua capacidade de tolerar os baixos níveis de pH do suco gástrico. O ácido clorídrico (HCl) secretado no estômago apresenta pH 0,9, contudo, a presença do alimento no estômago pode aumentar este valor para o nível de pH 3, sendo que, após a ingestão, o alimento permanece de 2 a 4 horas no estômago. A ação do baixo pH constitui-se em uma barreira eficiente contra organismos invasores do aparelho digestório, impedindo sua colonização no intestino delgado. Sendo assim, para o probiótico sobreviver, é fundamental que ele seja tolerante a essa condição (ECKERT, 2016).

Existem vários testes para comprovar a funcionalidade probiótica, segundo Mishra e Prasad (2005) os testes de resistências a sais biliares, resistência a acidez, produção de compostos antimicrobianos e sobrevivência no aparelho digestório são importantes para caracterizar uma cepa como probiótica, mas os mecanismos antagônicos de competência pelos nutrientes e pelos sítios de adesão ao epitélio e/ou mucosa intestinal é um dos mais importantes, já que a partir da adesão o microrganismo conseguira modular o sistema imune beneficiando a saúde do hospedeiro e poderá produzir biomoléculas que evitaram a propagação de patógenos. A adesão pode ser medida mediante testes *in vitro* utilizando células caco-2, mediante ensaios de hidrofobicidade ou por testes de Autoagregação e co-agregação bactéria-bactéria (Busscher et al., 1997).

O aparelho digestório humano é um complexo ecossistema, no qual bactérias residentes e em trânsito coexistem. Essa microbiota executa um papel importante nas funções fisiológicas e metabólicas, que incluem a manutenção do aparelho digestório, estando diretamente associado ao sistema imune. O desequilíbrio desse sistema é relacionado a diversas doenças gastrintestinais, que incluem colites ulcerativas, síndrome do intestino irritado, doença de Crohn, entre outros. As bactérias do ácido láctico (BALs) constituem-se a microbiota dominante do intestino delgado, de forma que as células imunes estão diretamente associadas com a mucosa intestinal. Sendo assim, muitas BALs consideradas probióticas tem sido aplicada como uma terapia alternativa na prevenção dessas doenças (SOCCOL et al., 2010; BARBERI et al., 2015; VARANKOVICH; NICKERSON; KORBER, 2015; ECKERT, 2016; FOLIGNÉ et al., 2016).

O potencial de adesão de BALs as células do epitélio intestinal têm um papel fundamental nessa interação e regulação do sistema imune, considerados um dos principais

critérios na seleção de microrganismos probióticos. *Lactobacillus* e *Bifidobacterium*, principalmente, contribuem para a ação inibidora da colonização de bactérias patogênicas e auxiliam na persistência do probiótico no intestino por um período prolongado. O efeito da adesão de BALs em células epiteliais é amplamente estudado, assim como os mecanismos envolvidos. Da aderência resulta uma interação entre a cepa e a superfície da mucosa intestinal, promovendo benefícios na modulação dos efeitos imunológicos e a exclusão competitiva de bactérias patogênicas (RIEDEL et al., 2006; VANDERPOOL; YAN; POLK, 2008; VARANKOVICH; NICKERSON; KORBER, 2015; ECKERT, 2016).

Considerando a dificuldade de avaliação da propriedade de adesão de BALs *in vivo*, modelos *in vitro* foram desenvolvidos com células epiteliais, e vêm sendo amplamente utilizados. A autoagregação e a coagregação dos probióticos também é um mecanismo importante que envolve um ou mais microrganismos, realizando um processo necessário para ocorrer a adesão ao epitélio intestinal. Uma vez que pode formar barreiras que previnem a colonização por microrganismos patogênicos (REID et al, 1988; BORIS; SUA´REZ; BARBE´S, 1997; DEL RE et al, 2000; ECKERT, 2016).

3. CONSIDERAÇÕES GERAIS

A partir dos conhecimentos fornecidos pela atual pesquisa, confirmou-se que o cupuaçu é viável para a produção de bebidas probióticas, além de ser um substrato promissor, devido que sua produção está em constante crescimento e pelo aumento do seu reconhecimento econômico e nutricional, como também uma alternativa como meio de fermentação para produção de bebidas contendo microrganismos probióticos, uma vez que não foi observada perda de viabilidade no processo de fermentação. As sementes de cupuaçu possuem importantes compostos bioativos, que agregam capacidade antioxidante, e se sobressaem como uma alternativa para a obtenção de extratos líquidos ou em pó, para serem utilizadas como substitutos do leite, por exemplo, em um processo de fermentação, além de que a bebida probiótica de cupuaçu mostrou-se vantajosa devido ao crescimento microbiano mais rápido, em comparação com outras frutas estudadas.

Desta maneira, pode-se concluir que é viável a utilização de subprodutos como as sementes do cupuaçu, os quais são geralmente desperdiçados ou descartados, para o desenvolvimento de novos produtos, com o intuito de reduzir perdas de produção, estimular mais os lucros e alavancar o potencial das agroindústrias, gerando assim mais renda.

REFERÊNCIAS

- ABRAFRUTAS, 2022. Dados de exportação em 2021. Disponível em: <https://abrafrutas.org/2022/02/dados-de-exportacao-em-2021/>. Acesso em: 9 fev. 2023.
- AGUILAR-TOALÁ, J. E. et al. Postbiotics: An evolving term within the functional foods field. **Trends in Food Science and Technology**, v. 75, p. 105–114, 2018.
- ANTUNES, A. E. C. et al. Probióticos: agentes promotores de saúde. **Brazilian Food Nutrition**, v. 32, n. 3, p. 103–122, 2007.
- ANVISA. A. N. DE V. S. Alimentos. **Alimentos com alegações de propriedades funcionais e ou de saúde, novos alimentos, ingredientes, substâncias bioativas e probióticos**. IX – Lista das alegações de propriedades funcionais aprovadas. Julho. 2008.
- ANVISA, A. N. DE V. S. Resolução- **RDC nº 44, de 19 de setembro de 2011**, Dispõe sobre o regulamento técnico para fórmulas infantis de seguimento para lactentes e crianças de primeira infância. Diário Oficial da União, Poder Executivo, Brasília, DF, 19 de set. 2011.
- ANVISA, A. N. DE V. S. Resolução- **RDC nº 54, de 12 de novembro de 2012**, Dispõe sobre o Regulamento Técnico sobre Informação Nutricional Complementar. Diário Oficial da União, Poder Executivo, Brasília, DF, 12 de nov. 2012.
- ANVISA, A. N. DE V. S. Guia para comprovação da segurança de alimentos e ingredientes. Gerência de Produtos Especiais – Gerência Geral de Alimentos. **Brasília (DF): Ministério da Saúde**, 2013.
- ANVISA, A. N. DE V. S. Guia para instrução processual de petição de avaliação de probióticos para uso em alimentos. **Brasília (DF): Ministério da Saúde**, v. 21, n. 1, p. 1–58, 2019.
- AOAC, 2012. Official Methods of Analysis of AOAC INTERNATIONAL. J. Assoc. Off. Agric. Chemists 19th. Ed, 1–95.
- BARBERI, C.; et al. T cell polarizing properties of probiotic. **Bacteria. Immunology letters**, v.168, n.2, p.337-342, 2015.
- BARBOSA, F. H. F. et al. O Gênero Bifidobacterium: Dominância a favor da vida. **Ciência Equatorial**, v. 1, n. 2, 2011.
- BASTOS, G. A.; PAULO, E. M.; CHIARADIA, A. C. N. Estabilidade de micro-organismos potencialmente probióticos em barra de cereais - efeito da técnica de incorporação. **Revista de Ciências Farmaceuticas Basica e Aplicada**, v. 36, n. 2, p. 311–317, 2015.
- BORIS, S.; SUA´REZ, J.E; BARBE´S, C. Characterization of the aggregation promoting factor from Lactobacillus gasserii, a vaginal isolate. **J. Appl. Microbiol.**, v.83, p. 413–420, 1997.
- BRAND-WILLIAMS, W, CUVÉLIER, ME, BERSET, C. Use of a Free Radical Method to Evaluate Antioxidant Activity. **LWT - Food Sci Technol**. 1995;28:25–30.

BUSSCHER, W.J.; BAUER, P.J.; CAMP, C.R.; SOJKA, R.E. Correction of cone index for soil water content differences in a coastal plain soil. **Soil and Tillage Research**, v.43, n.2, p.205-217, 1997

CANUTO, G. A. B. et al. Caracterização físico-química de polpas de frutos da amazônia e sua correlação com a atividade anti-radical livre. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 32, n. 4, p. 1196–1205, 2010.

CARVALHO, A. V.; GARCÍA, N. H. P.; FARFÁN, J. A. Proteínas da semente de cupuaçu e alterações devidas à fermentação e à torração. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 28, n. 4, p. 986–993, 2008. DOI: <https://doi.org/10.1590/S0101-20612008000400035>

CARVALHO, A. V.; GARCÍA, N. H. P.; WADA, J. K. A. Caracterização físico-química e curvas de solubilidade proteica de sementes, amêndoas fermentadas e torradas de cupuaçu (*Theobroma grandiflorum* Schum). **Brazilian Journal of Food Technology**, v. 8, n. 2, p. 127–134, 2005.

CHAVES, M. A. et al. A rheological model for cupuassu (*Theobroma grandiflorum*) pulp at different concentrations and temperatures. **International Journal of Food Engineering**, v. 9, n. 4, p. 353–363, 2013.

COHEN, K. O., JACKIX, M. N. H. Características químicas e físicas da gordura de cupuaçu e da manteiga de cacau. Planaltina, DF: **Embrapa Cerrados**, 2009. 22 p.

COSTA, M. P. et al. Cupuassu (*Theobroma grandiflorum*) pulp, probiotic, and prebiotic: Influence on color, apparent viscosity, and texture of goat milk yogurts. **Journal of Dairy Science**, v. 98, n. 9, p. 5995–6003, 2015.

CUEVAS-GONZÁLEZ, P. F.; LICEAGA, A. M.; AGUILAR-TOALÁ, J. E. Postbiotics and paraprobiotics: From concepts to applications. **Food Research International**, v. 136, p. 1–12, 2020.

CURIMBABA, T. F. S. et al. Prebiotic, antioxidant and anti-inflammatory properties of edible Amazon fruits. **Food Bioscience**, v. 36, n. 100599, p. 1–10, 2020.

DA SILVA, F. L. B. et al. Understanding and Controlling Food Protein Structure and Function in Foods: Perspectives from Experiments and Computer Simulations. **Annual Review of Food Science and Technology**, v. 11, p. 365–387, 2020.

DA SILVA, L. M. R. et al. Quantification of bioactive compounds in pulps and by-products of tropical fruits from Brazil. **Food Chemistry**, v. 143, p. 398–404, 2014.

DE BRUIJN, G. J. et al. Using implicit associations towards fruit consumption to understand fruit consumption behaviour and habit strength relationships. **Journal of Health Psychology**, v. 17, n. 4, p. 479–489, 2012.

DEL RE, B.; et al. Adhesion, autoaggregation and hydrophobicity of 13 strains of *Bifidobacterium longum*. **Lett. Appl. Microbiol.**, v. 31, p.438–442, 2000.

DIAS, J. D. M., et al. Desenvolvimento e avaliação das características físico-químicas e da aceitação sensorial de doce em massa de cupuaçu. **Boletim do Centro de Pesquisa de Processamento de Alimentos**, v. 36, n. 1, 2019.

DIMITROVSKI, D. et al. Apple juice as a medium for fermentation by the probiotic *Lactobacillus plantarum* PCS 26 strain. **Annals of Microbiology**, v. 65, n. 4, p. 2161–2170, 2015.

DUARTE, W. F. et al. Characterization of different fruit wines made from cacao, cupuassu, gabioba, jaboticaba and umbu. **LWT - Food Science and Technology**, v. 43, n. 10, p. 1564–1572, 2010.

ECKERT, C. **Bactérias lácticas: avaliação da resistência ao trato gastrintestinal simulado e encapsulamento com soros lácteos**. Dissertação para obtenção do grau de Mestre em Biotecnologia: Centro Universitário UNIVATES, Lajeado, Brasil, 2016.

EMBRAPA, 2022. Ciência e tecnologia tornaram o Brasil um dos maiores produtores mundiais de alimentos. Disponível em: <https://www.embrapa.br/busca-de-noticias/-/noticia/75085849/ciencia-e-tecnologia-tornaram-o-brasil-um-dos-maiores-produtores-mundiais-de-alimentos>. Acesso em: 09 fev. 2023.

FENG, K. et al. Growth Potential of *Listeria Monocytogenes* and *Staphylococcus Aureus* on Fresh-Cut Tropical Fruits. **Journal of Food Science**, v. 80, n. 11, p. M2548–M2554, 2015.

FERREIRA, G. M.; GUIMARÃES, M. J. D. O. C.; MAIA, M. C. A. Efeito da temperatura e taxa de cisalhamento nas propriedades de escoamento da polpa de cupuaçu (*T. grandiflorum* Schum) integral. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 30, n. 2, p. 385–389, 2008.

FOLIGNÉ, B.; et al. Immunomodulation properties of multi-species fermented milks. **Food microbiology**, v.53, p.60-69, 2016.

FONTELES, T. V. et al. Stability and Quality Parameters of Probiotic Cantaloupe Melon Juice Produced with Sonicated Juice. **Food and Bioprocess Technology**, v. 6, n. 10, p. 2860–2869, 2013.

FOOKS, L. J.; FULLER, R.; GIBSON, G. R. Prebiotics, probiotics and human gut microbiology. **International Dairy journal**. v.9, p.53-61, 1999.

FULLER, R. Probiotics in man and animals. **Journal or applied Bacteriology**. v. 66, p. 365-378, 1989

GOH K.T., HAISMAN D. R., ARCHER R. H., SINGH H. Evaluation and modification of existing methods for the quantification of exopolysaccharides in milk-based media. **Food Research Internacional**. v.38, p. 605 613, 2005

GONÇALVES, A. E. D. S. S.; LAJOLO, F. M.; GENOVESE, M. I. Chemical composition and antioxidant/antidiabetic potential of brazilian native fruits and commercial frozen pulps. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 58, n. 8, p. 4666–4674, 2010.

GRANATO, D. et al. Functional Foods: Product Development, Technological Trends, Efficacy Testing, and Safety. **Annual Review of Food Science and Technology**, v. 11, p. 93–118, 2020.

GUARNER, F. Papel de la flora intestinal en la salud y em la enfermedad. **Nutrición Hospitalaria, Madrid**, v. 22, n. 2, p. 14-19, maio 2007.

GUARNER, F. et al. Diretriz mundial da WGO - Probióticos e prebióticos. **World Gastroenterology Organisation**, p. 35, 2017.

GUIMARÃES, J. T. et al. High-intensity ultrasound: A novel technology for the development of probiotic and prebiotic dairy products. **Ultrasonics Sonochemistry**, v. 57, p. 12–21, 2019.

HENRY, C. J. Functional foods. **European Journal of Clinical Nutrition**, v. 64, n. 7, p. 657–659, 2010.

HERNÁNDEZ-TORRES, D. L. **Cinética, formulação e funcionalidade de fermentados de farinha de yacon (*S. sonchifolius*) e amendoim (*Arachis hypogae L.*) por quatro linhagens probióticas**. Dissertação para obtenção do título de mestre em Ciência dos Alimentos: Universidade Federal de Lavras, Minas Gerais, Brasil, 2019.

JENSEN, H.; et al. L. In vitro testing of commercial and potential probiotic lactic acid bacteria. **International Journal of Food Microbiology**. v.153, p. 216–222, 2012.

JORGE, L. H. A. Cultivo e Beneficiamento do cupuaçu. **Dossiê Técnico**. SENAI/AM - Escola SENAI "Antônio Simões". 2011.

LARRAURI JA, RUPÉREZ P, SAURA-CALIXTO F. Effect of drying temperature on the stability of polyphenols and antioxidant activity of red grape pomace peels. **J Agric Food Chem**. 1997;45:1390–3.

LOPES, T. DOS R.; PINTO, M. A. DE O. Aplicação terapêutica de *Saccharomyces boulardii* em diarreias: uma revisão. **HU Revista**, v. 36, n. 2, p. 107–122, 2010.

LOURENS-HATTINGH, A.;VILJOEN, B. C. Yogurt as probiotic carrier food. **International Dairy Journal**. v. 11, p. 1-17, 2001

MACHADO-MOREIRA, B. et al. Microbial Contamination of Fresh Produce: What, Where, and How? **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, v. 18, n. 6, p. 1727–1750, 2019.

MAPA. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade de Bebida Láctea**, Instrução Normativa No. 16, 23 de agosto de 2005.

MARSH, A. J. et al. Fermented beverages with health-promoting potential: Past and future perspectives. **Trends in Food Science and Technology**, v. 38, n. 2, p. 113–124, 2014.

MARTIN, J. H. Technical consideration for incorporating bifidobacteria and bifidogenic factors into dairy products. **International Dairy Federation Bulletin**. n. 313, p.49-51, 1996.

MAUGERI FILHO, F. et al. Alimentos funcional, composição probiótica, composição alimentícia e processo de produção de alimento funcional fermentado a base de soja, contendo agentes probióticos e prebióticos. 2005, Brasil. Instituição de registro: INPI - Instituto Nacional da Propriedade Industrial. Instituição(ões) financiadora(s): Unicamp. **Privilégio de Inovação. BR n. PI05040566.** Depósito: 06 set. 2005. Concessão: 02 fev. 2016.

MEILGAARD, M., CIVILLE, G. V., CARR, B. T. Sensory Evaluation Techniques. CRC Press, 387 p. 1999.

MENEZES, M. S., et al. Effect of fermentation with *Lactobacillus acidophilus* on the bioactive compounds, antioxidant activity, and sensory properties of cupuassu (*Theobroma grandiflorum*) pulp. **Journal of Food Science**, 83(8), 2122-2128. 2018.

MISHRA, V.; PRASAD, D. N. Application of in vitro methods for selection of *Lactobacillus casei* strains as potential probiotics. **Int J Food Microbiol** v. 103 (1): p. 109-115. 2005.

MONDRAGÓN-BERNAL, O. L.; MAUGERI, F. Review: Bacterias lácticas: Funcionalidad, polisacáridos, potencial terapéutico y aplicaciones en alimentos. **Revista Publicaciones e Investigación**, v. 2, n. 1, p. 69–96, 2008.

MONDRAGÓN-BERNAL, O. L. **Desenvolvimento de alimento simbiótico fermentado de soja.** Tese de doutorado apresentada à Faculdade de Engenharia de Alimentos da Universidade Estadual de Campinas UNICAMP, para obtenção do título de Doutor em Engenharia de Alimentos. UNICAMP, Campinas, Brasil, 2009.

MONDRAGÓN-BERNAL, O. L. et al. Stability and functionality of synbiotic soy food during shelf-life. **Journal of Functional Foods**, v. 35, p. 134–145, 2017. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jff.2017.05.021>.

MONTEAGUDO-MERA, A.; et al. In vitro evaluation of physiological probiotic properties of diferente lactic acid bacteria strains of dairy and human origin. **Journal of functional foods**. v. 4, p. 531-541, 2012.

MULET-CABERO, A. I., et al. **A standardised semi-dynamic in vitro digestion method suitable for food – an international consensus.** *Food Funct.*, 2020, 11, 1702–1720.

NASCIMENTO, R. P., et al. **Microbiologia industrial: bioprocessos.** volume 1. 1 ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2018. 674 p.

NGOME, M. T. et al. Inoculum concentration and inoculation time for propionic acid production from whey using mixed culture of *Lactobacillus helveticus* and *Propionibacterium freudenreichii* PS-1. **Acta Scientiarum - Technology**, v. 39, p. 543–550, 2017.

OLIVEIRA, R. P. S., et al. Growth and survival of mixed probiotics in nonfat fermented milk: the effect of inulin. **Chemical Engineering Transactions**, 24, 457-462. 2011.

OLIVEIRA, P. D. P. DE et al. Segurança e Benefício do Uso de Probióticos em Pacientes Submetidos ao TCTH: Revisão Integrativa. **Revista Brasileira de Cancerologia**, v. 65, n. 4, p. 1–8, 2019.

ORNELLAS, R. M. S. et al. Selection of Lactic Acid Bacteria with Probiotic Potential Isolated from the Fermentation Process of “Cupuaçu” (*Theobroma grandiflorum*). **Advances in Microbiology, Infectious Diseases and Public Health.**, v. 973, p. 1–16, 2017. DOI: 10.1007/5584_2017_5.

PAIS, P. et al. *Saccharomyces boulardii*: What makes it tick as successful probiotic? **Journal of Fungi**, v. 6, n. 78, p. 1–16, 2020.

PENA JÚNIOR (ORG.), M. A. G. Demandas de pesquisa para a Amazônia Legal. Documentos / **Embrapa Estudos e Capacitação**, ISSN 2237-7298; n.03, 348 p. Brasília, DF, 2011.

PEREIRA, A. L. F. et al. Impact of fermentation conditions on the quality and sensory properties of a probiotic cupuassu (*Theobroma grandiflorum*) beverage. **Food Research International**, v. 100, n. 1, p. 603–611, 2017.

PEREIRA, A. A. R.; LUSNE, A. P. I. Probióticos e prebióticos na prevenção e tratamentos de doenças. **Revista Brasileira Multidisciplinar - ReBram**. Vol. 22, n.3, 2019. DOI: <https://doi.org/10.25061/2527-2675/ReBraM/2019.v22i3.677>.

POMBO, J. C. P. et al. Optimization of the spray drying process for developing cupuassu powder. **Journal of Food Science and Technology**, p. 1–13, 2020.

PUGLIESE, A. G. et al. Flavonoids, proanthocyanidins, vitamin C, and antioxidant activity of theobroma grandiflorum (Cupuassu) pulp and seeds. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 61, n. 11, p. 2720–2728, 2013.

PULIDO R., BRAVO L., SAURA-CALIXTO F. Antioxidant Activity of Dietary Polyphenols As Determined by a Modified Ferric Reducing/Antioxidant Power Assay. **J Agric Food Chem**. 2000;48:3396–402

QUIJANO, C. E.; PINO, J. A. Volatile compounds of copoazú (*Theobroma grandiflorum* Schumann) fruit. **Food Chemistry**, v. 104, n. 3, p. 1123–1126, 2007.

RAMOS, S. et al. Influence of pulp on the microbial diversity during cupuassu fermentation. **International Journal of Food Microbiology**, v. 318, n. 108465, p. 1–14, 2020.

RAMOS, S. D. N. M. **INFLUÊNCIA DOS MICRORGANISMOS ENVOLVIDOS NO PROCESSO DE FERMENTAÇÃO DE CUPUAÇU (*Theobroma grandiflorum* Schum) NA FORMAÇÃO DO SABOR INFLUENCE**. [s.l.] Tese (Doutorado em Tecnologia de Alimentos). UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS, Campinas. 2015.

RAYNOR, H. A.; OSTERHOLT, K. M. Greater variety of fruit served in a four-course snack increases fruit consumption. **Appetite**, v. 59, n. 3, p. 662–667, 2012.

REID, G.; MCGROARTY, J.A.; ANGOTTI, R.; COOK, R.L. Lactobacillus inhibitor production against *Escherichia coli* and coaggregation ability with uropathogens. **Canadian, J. Microbiol**, v.34,p. 344–351, 1988.

RE, R., et al.. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. **Free Radic Biol Med**. 1999;26(9/10):1231–7.

RIEDEL, C. U.; et al. Interaction of bifidobacteria with Caco-2 cells—adhesion and impact on expression profiles. **International journal of food microbiology**, 110(1), 62-68, 2006.

RODRIGUES, M. I.; IEMMA, A. F. **Planejamento de Experimentos e Otimização de Processos**. 3. ed. São Paulo: Cárita, 2014.

ROGEZ, H. et al. Chemical composition of the pulp of three typical Amazonian fruits: Araçaboi (*Eugenia stipitata*), bacuri (*Platonia insignis*) and cupuaçu (*Theobroma grandiflorum*). **European Food Research and Technology**, v. 218, n. 4, p. 380–384, 2004.

SAAD, S. M. I. Probióticos e prebióticos: o estado da arte. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences** vol. 42, n. 1, jan./mar., 2006.

SAARELA, M; MOGENSEN, G.; FONDÉN, R.; MÄTTÖ, J.; MATTILA-SANDHOLM, T. Probiotic bacteria: safety, functional and technological properties. **Journal of Biotechnology**. v. 84, p. 197-215, 2000.

SARKAR, A.; MANDAL, S. Bifidobacteria—Insight into clinical outcomes and mechanisms of its probiotic action. **Microbiological Research**, v.192, p.159-171, 2016.

SILVA, R.N.; MONTEIRO, V.N.; ALCANFOR, J.D.X.; ASSIS, E. M.; ASQUIERI, E.R. Comparação de métodos para a determinação de açúcares redutores e totais em mel. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**. v.23, n.3, 2003.

SILVA FILHO, F. L. DA et al. Avaliação de propagandas de alimentos com alegação funcional disponibilizadas em sites brasileiros. **Saúde (Santa Maria)**, v. 44, n. 2, p. 1–14, 2018.

SILVA, J. C., et al. Effect of *Lactobacillus rhamnosus* GG fermentation on antioxidant properties and sensory attributes of cupuaçu pulp. **Food Chemistry**, 318, 126508. 2020.

SILVA, M. A. et al. Melon (*Cucumis melo* L.) by-products: Potential food ingredients for novel functional foods? **Trends in Food Science and Technology**, v. 98, p. 181–189, 2020.

SISTEMA IBGE DE RECUPERAÇÃO AUTOMÁTICA. **Censo agropecuário**. Disponível em: <<https://sidra.ibge.gov.br/pesquisa/censo-agropecuario/referencias>>. Acesso em: 27 de outubro de 2020.

SOCCOL, C. R.; et al. The Potential of Probiotics: A Review. **Food Technology Biotechnology**, v. 48, p.413– 434, 2010.

SOUZA, A. DAS G. C. DE; ALVES, R. M.; SOUZA, M. G. DE. **Cupuaçu *Theobroma grandiflorum***. Procisur ed. [s.l.] Instituto Interamericano de Cooperación para la Agricultura (IICA), 2017.

SOUZA, F. S. et al. Prebióticos, probióticos e simbióticos na prevenção e tratamento das doenças alérgicas. **Revista Paulista de Pediatria**, v. 28, n. 1, p. 86–97, 2010.

SOUZA, J. M. L. et al. Monitoring and optimization of cupuaçu seed fermentation, drying and storage processes. **Microorganisms**, v. 8, n. 9, p. 1–34, 2020.

STIEMSMA, L. T. et al. Does Consumption of Fermented Foods Modify the Human Gut Microbiota? **The Journal of nutrition**, v. 150, n. 7, p. 1680–1692, 2020.

STURMER, E. S. et al. A importância dos probióticos na microbiota intestinal humana. **Rev Bras Nutr Clin**, v. 27, n. 4, p. 264–272, 2012.

TAMIME, A., MARSHALL, V. ROBINSON, R.. Microbiological and technological aspects of milks fermented by bifidobacteria. *Journal of Dairy Research*. v. 62 p. 151-187,

TAYLOR, B. C. et al. Consumption of Fermented Foods Is Associated with Systematic Differences in the Gut Microbiome and Metabolome. **mSystems**, v. 5, n. 2, p. 1–16, 2020.

VANDERPOOL, C.; YAN, F.; POLK, D. B. Mechanisms of probiotic action: implications for therapeutic applications in inflammatory bowel diseases. **Inflammatory bowel diseases**, v.14, n.1, p.1585-1596, 2008.

VARANKOVICH, N. V.; NICKERSON, M. T.; KORBER, D. R. Probiotic-based strategies for therapeutic and prophylactic use against multiple gastrointestinal diseases. **Frontiers in microbiology**, 6, 2015.

VILLACÍS-CHIRIBOGA, J. et al. Valorization of byproducts from tropical fruits: Extraction methodologies, applications, environmental, and economic assessment: A review (Part 1: General overview of the byproducts, traditional biorefinery practices, and possible applications). **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, v. 19, n. 2, p. 405–447, 2020.

VILLEGAS, B.; CARBONELL, I.; COSTELL, E. Effects of product information and consumer attitudes on responses to milk and soybean vanilla beverages. **Journal of the science of food and agriculture**, v. 88, n. 14, p. 2426–2434, 2008.

VINDEROLA, G. et al. Cell viability and functionality of probiotic bacteria in dairy products. **Frontiers in Microbiology**, v. 2, n. MAY, p. 1–6, 2011.

VODNAR, D. C. et al. HPLC characterization of lactic acid formation and FTIR fingerprint of probiotic bacteria during fermentation processes. **Notulae Botanicae Horti Agrobotanici Cluj-Napoca**, v. 38, n. 2, p. 109–113, 2010.

WATERHOUSE A. L. Determination of total phenolics. **Curr Protoc Food Anal Chem**. 2002;11(1):130–43.

WGO, World Gastroenterology Organisation. Diretrizes Mundiais da Organização Mundial de Gastroenterologia: probióticos e prebióticos. 2017.

Capítulo 2 ARTIGO

FORMULAÇÃO E SELEÇÃO DE MICRORGANISMOS PARA DESENVOLVIMENTO DE BEBIDA PROBIÓTICA À BASE DE CUPUAÇU (*Theobroma grandiflorum*)

Katherine Leslie Ayres Moura¹, José Guilherme Lembi Ferreira Alves¹ e Olga Lucia Mondragón-Bernal¹

¹Departamento de Ciências de Alimentos – DCA, Programa de Pós-graduação em Engenharia de Alimentos – Universidade Federal de Lavras (UFLA) Caixa Postal 3037 – 37200-000 – Lavras, MG – Brasil

katherine_moura@hotmail.com, jlembi@ufla.br, olga@ufla.br

RESUMO

O cupuaçu possui alto valor nutritivo, propriedades funcionais e potencial para agregação de valor. O objetivo foi avaliar o efeito de variáveis de formulação e fermentação do meio à base de cupuaçu e extrato hidrossolúvel da amêndoa do cupuaçu. Para a obtenção dos protótipos, os meios fermentativos foram inoculados com *Saccharomyces boulardii-17* (SB), *Lactobacillus rhamnosus* sp (LR) e *Bifidobacterium longum* sp (BL). Analisou-se a capacidade de fermentação de cada microrganismo e sua viabilidade por ensaios preliminares, observando a cinética de crescimento celular, açúcares redutores e totais (AR e AT), pH e acidez titulável total (ATT). Ensaios com SB e LR apresentaram as maiores contagens de crescimento celular total (CCT) e maiores consumos de AT. Foi realizado um delineamento Plackett&Burman 12 com 4 pontos centrais e sete variáveis independentes. Obtiveram-se efeitos estatisticamente significativos e positivos sobre o CCT. Nos ensaios dos pontos centrais 50:50 (LR:SB) foram obtidos os melhores resultados na produção de exopolissacarídeos (EPS). O ensaio com apenas LR (37°C; 20% EHAC; 12h) e pontos centrais 50:50 (LR:SB) apresentaram os maiores consumos de AT e para AR foram os ensaios seis (37°C, SC=8%, 12h) e ponto central. O ensaio 5 com apenas LR (37°C; 20% EHAC; 12h) apresentou a maior variação do pH após 12h de fermentação. Conclui-se que os probióticos SB e LR fermentam o meio a base de polpa e extrato de cupuaçu, resultando em uma opção para o mercado de bebidas com funcionalidade pós-probiótica. É recomendável a fermentação individual, só com levedura ou só com bactérias lácticas, uma vez que a mistura dos microrganismos não contribuiu para o aumento do crescimento celular total, não havendo uma simbiose.

Palavras-chave: Alimentos funcionais; *Theobroma grandiflorum*; probióticos; delineamento Plackett&Burman, *Saccharomyces boulardii-17*, *Lactobacillus rhamnosus*.

1. INTRODUÇÃO

O mercado de bebidas fermentadas e à base de frutas, principalmente as tropicais, está em expansão. Essa combinação visa aumentar o valor nutricional da bebida, combinando os nutrientes oferecidos por várias frutas. O cupuaçu pode ser utilizado na fabricação de bebidas alcoólicas fermentadas, criada a partir da fermentação de um fruto maduro e sadio pela atividade de leveduras (SILVA, 2011).

Além da sua utilização para a produção de bebidas comuns, o cupuaçu pode ser utilizado para a produção de bebidas probióticas. Os probióticos conseguem permanecer vivos durante a vida útil de um alimento, não contêm genes de resistência a antibióticos, não possuem qualidades de mutagênese, são anticancerígenos e são resistentes a fagos e oxigênio. Segundo Organização Mundial da Saúde, os probióticos são "microrganismos vivos" que oferecem vantagens à saúde do hospedeiro, aumentando o número de bactérias úteis e diminuindo o número de micróbios nocivos (DA SILVA, 2022).

Por possuir a maior floresta tropical do mundo, a região amazônica passou por várias fases de desenvolvimento e oferece diversas oportunidades de exploração de recursos. Assim, investigações sobre o potencial da Amazônia têm sido realizadas em diversos setores visando descobrir novos nutrientes e fontes funcionais. A diversidade de substâncias bioativas nos alimentos exige pesquisas incessantes sobre suas qualidades físico-químicas, microbiológicas e sensoriais (DA SILVA, 2022).

Há vantagem tecnológica em utilizar a bebida de cupuaçu como substrato para fermentação probiótica como substituto do leite, para atender públicos que buscam alternativas veganas ou não lácteas. Os açúcares naturais e os ácidos orgânicos da bebida a tornam um bom local para o cultivo de probióticos. A fermentação pode proporcionar o aumento da atividade antioxidante, conferindo benefícios nutricionais a este alimento funcional (RODRÍGUEZ et al., 2018). Indivíduos com alguns distúrbios (intolerância à lactose, alergia a componentes do leite e veganos) também podem se beneficiar da ingestão dessas bactérias quando consomem sucos de frutas contendo probióticos.

Saccharomyces boulardii é uma cepa tropical de levedura identificada em 1923 a partir de frutas de lichia e mangostão pelo cientista francês Henri Boulard. Verificou-se que *S. boulardii* mantém e repara a flora intestinal nos intestinos delgado e grosso; não são de origem intestinal e apresentam ação probiótica. Restaura a flora intestinal e promove o equilíbrio bacteriano intestinal em quantidades ótimas, além de tratar a diarreia e outras irritações intestinais (NARDI, 2005).

Bifidobacterium longum é um tipo de bactéria não patogênica encontrada nos sistemas gastrointestinais de humanos e da maioria dos outros animais. Devido a seus muitos benefícios para a saúde, é usado como probiótico em uma variedade de alimentos e suplementos nutricionais. É uma bactéria gram-positiva, ramificada e em forma de bastonete que produz ácido láctico no trato digestivo pela fermentação do açúcar (CELIBERTO, 2014).

Lactobacillus rhamnosus é uma bactéria em forma de bastonete, formadora de cadeia, Gram-positiva, não formadora de esporos, facultativamente anaeróbia e homofermentativa. Certas cepas da bactéria *L. rhamnosus* são usadas como probióticos e são notavelmente eficazes no tratamento de infecções do trato urogenital feminino, particularmente casos de vaginose bacteriana de difícil cura. Sua natureza probiótica pode ajudar a diminuir alergias, asma e dermatite. Tem vários outros benefícios, incluindo propriedades anticancerígenas e de perda de peso (MACEDO et al., 2008).

Ramos et al., (2016), analisaram que durante o processo de despolpamento do cupuaçu ocorre uma redução considerável de compostos voláteis importantes, no entanto, durante o processo de fermentação do cupuaçu ocorre o processo de formação dos mesmos. No experimento com 15% de polpa, encontrou-se uma diversidade mais ampla de importantes compostos voláteis como aldeídos, cetonas e álcoois. No experimento sem polpa, somente na fermentação das sementes, o tempo de fermentação foi menor, mas também não foram formados precursores para o desenvolvimento do sabor (RODRÍGUEZ et al., 2018).

O cupuaçu é considerado uma fruta ideal para a produção de sucos probióticos. A fruta contém antioxidantes como vitaminas C e E, flavonoides, antocianinas e polifenóis, além de sacarídeos (glicose, frutose e sacarose) e minerais (incluindo Na, K, Ca, Mg, P, Fe, Zn e Cu).

Portanto, os objetivos deste trabalho foram determinar os melhores microrganismos probióticos a serem utilizados na fermentação do cupuaçu, determinando a viabilidade dos mesmos nas bebidas demonstrando por meio de estudos cinéticos a produção de ácido láctico, consumo de açúcares e selecionar as melhores condições de fermentação para otimização do processo. Procurou-se uma formulação que agregasse valor e para tal foram realizados testes de caracterização funcional.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1 MATÉRIA-PRIMA

As formulações dos meios fermentativos foram realizadas com diversas concentrações de polpa do cupuaçu e extrato hidrossolúvel das amêndoas de cupuaçu, conforme P&B12. As

linhagens probióticas, utilizadas como inóculo para as fermentações, foram adquiridas em envelopes liofilizados, em farmácia, ou/e estoque de culturas do LEB/UFLA e mantidas a -20 °C, sendo: *Saccharomyces boulardii*, e linhagens de lactobacilos e bifidobactérias (*Lactobacillus rhamnosus* LR32 e *Bifidobacterium longum* LB04 da Danisco).

2.1.1 Ativação e Propagação dos Microrganismos Liofilizados

2.1.1.1 Ativação e propagação de *S. boulardii*

As cápsulas contendo 100 mg microrganismo liofilizado (Repoflor®, EMS S/A), foram abertos em condições assépticas. Para a ativação da *S. boulardii*-17 seguiu-se a metodologia de Bastos, Paulo, Chiaradia (2015), com modificações, adicionada a massa de 100 mg do liofilizado em 10mL de caldo YPG, previamente esterilizado em autoclave a 121 °C por 15 min, seguido por homogeneização e mantidos incubados em estufa incubadora (Solab modelo SL-223) a 28 °C, por 48 h, sob agitação de 150 rpm.

O caldo YPG (Yeast, Peptone, Glucose), possui a seguinte composição: extrato de levedura 1%, peptona 2%, glicose 2%. Para o ágar YPD é adicionado 2% de agar.

Após a ativação, todo o conteúdo da cultura ativada (10 mL) foi transferido a Erlenmeyers contendo 90 mL de caldo YPG mantido a 28°C. Após 24 h, os inóculos ativados e propagados, foram transferidos para eppendorfs e centrifugado (Spinlab modelo SL-5AM) a 4000 rpm por 10 minutos. O sobrenadante foi removido, e meio congelante estéril pH 7,2 (constituído por 15mL de glicerol, 0,5g de peptona bacteriológica, 0,3g de extrato de levedura, e NaCl 0,5%) foi acrescentado aos microrganismos concentrados. Os eppendorfs foram estocados em condições de congelamento (-20°C) para uso como cultura estoque (BASTOS; PAULO; CHIARADIA, 2015; HERNÁNDEZ-TORRES, 2019).

2.1.1.2 Ativação e propagação de Lactobacilos e Bifidobactérias

A ativação dos lactobacillus e bifidobactérias foi realizada seguindo a metodologia de Hernández-Torres (2019) adaptado de Mondragón-Bernal et al. (2017), onde 1g do microrganismo liofilizado foi transferido para 10mL de caldo MRS enriquecido com 0,05% (m/v) de L-cisteína, previamente esterilizado em autoclave a 121 °C por 15 min, e mantidos em estufa incubadora (Solab modelo SL-223) a 37 °C por 48 h.

O caldo MRS (De Man, Rogosa e Sharpe) possui a seguinte composição: peptona bacteriológica 10g, extrato de carne 10g, extrato de levedura 4g, D-glicose 20g, Tween-80 1g,

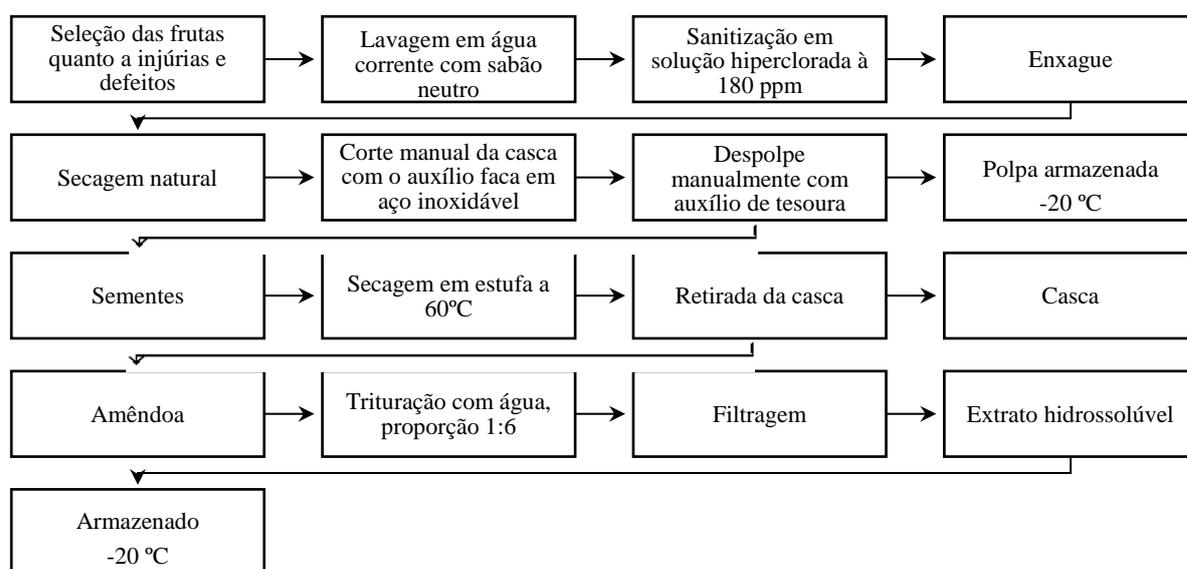
fosfato dipotássio 2g, acetato de sódio 5g, Citrato de tri-amônio 2g, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0,2g, $MnSO_4 \cdot 4H_2O$ 0,05g. O meio foi enriquecido com hidrócloro de L-cisteína monohidratado, cuja fórmula de molecular é $C_3H_8NO_2S \cdot Cl \cdot H_2O$.

Todo o conteúdo de cada cultura ativada (10mL) foi transferido a erlenmeyers contendo 90mL de caldo MRS enriquecido com L-cisteína a 37 °C. Após 24 h, os inóculos ativados e propagados, foram transferidos para eppendorfs e centrifugados (Spinlab modelo SL-5AM) a 7126g por 5 minutos. O sobrenadante foi removido, e meio congelante estéril pH 7,2 (constituído por 15mL de glicerol, 0,5g de peptona bacteriológica, 0,3g de extrato de levedura, e NaCl 0,5%) foi acrescentado aos microrganismos concentrados. Os eppendorfs foram estocados em condições de congelamento (-20°C) para uso como cultura estoque, metodologia adaptado de Mondragón-Bernal et al. (2017), por Hernández-Torres (2019).

2.1.2 Processamento do Cupuaçu e Obtenção do Extrato Hidrossolúvel

A polpa e as sementes do cupuaçu (*T. grandiflorum*) utilizadas nos experimentos foram provenientes de comerciantes locais na cidade de Ariquemes/RO. Os cupuaçus foram previamente selecionados observando-se algumas características, como cor, danos físicos, estado de maturação, qualidade da casca e tamanho. Para a obtenção da polpa e extrato hidrossolúvel das amêndoas, foram realizadas as seguintes etapas apresentadas no Fluxograma abaixo (Figura 2.1).

Figura 2.1 - Fluxograma obtenção da polpa e extrato hidrossolúvel da amêndoa de cupuaçu.



2.2 PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL

Foi realizado um Planejamento experimental Plackett&Burman12 (P&B12) com 7 variáveis independentes (Proporção de concentração de *S. boulardii* (SB) e *Lactobacillus rhamnosus* (LR)– x1; Temperatura– x2; Teor polpa– x3; Teor de extrato hidrossolúvel das amêndoas– x4; Teor de farinha de arroz– x5; Teor de sacarose– x6 e pH– x7), totalizando 12 tratamentos e 4 pontos centrais, conforme Tabelas 2.1 e 2.2 abaixo:

Tabela 2.1 - Relação entre valores codificados e reais utilizados no Plackett&Burman 12.

Variáveis	-1	0	+1
x1 – LR:SB (%)	0:100	50:50	100:0
x2 – Temperatura (°C)	28	32,5	37
x3 – Teor polpa (%)	45	60	75
x4 – Teor de extrato hidrossolúvel de amêndoas (%v/v)	0	10	20
x5 – Teor de farinha de arroz (%m/v)	0	2,5	5
x6 – Teor sacarose (%m/v)	0	4	8
x7 – pH	3,9	4,5	5,1

Fonte: Autoral, 2021.

Tabela 2.2 - Matriz do Planejamento Plackett&Burman 12 com 4 pontos centrais.

Ensaio	x1 – LR:SB (%)	x2 – Temperatura (°C)	x3 – Teor polpa (%)	x4 – Teor EHAC (%v/v)	x5 – Teor farinha arroz (%m/v)	x6 – Teor sacarose (%m/v)	x7 - pH
1	1	-1	1	-1	-1	-1	1
2	1	1	-1	1	-1	-1	-1
3	-1	1	1	-1	1	-1	-1
4	1	-1	1	1	-1	1	-1
5	1	1	-1	1	1	-1	1
6	1	1	1	-1	1	1	-1
7	-1	1	1	1	-1	1	1
8	-1	-1	1	1	1	-1	1
9	-1	-1	-1	1	1	1	-1
10	1	-1	-1	-1	1	1	1
11	-1	1	-1	-1	-1	1	1
12	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1
13	0	0	0	0	0	0	0
14	0	0	0	0	0	0	0
15	0	0	0	0	0	0	0
16	0	0	0	0	0	0	0

Fonte: RODRIGUES & IEMMA, 2014

Considerando que a polpa e o extrato hidrossolúvel da amêndoa do cupuaçu possuem em sua composição um baixo teor de proteína, foi adicionado ao meio fermentado uma proporção de farinha de arroz, com o intuito de aumentar este teor em sua composição, e desta maneira estudar a influência desta fonte de nutriente para os microrganismos no meio fermentado. A sacarose foi adicionada com o objetivo no melhoramento do sabor.

O pH de cada meio fermentativo foi ajustado conforme estipulado no planejamento com carbonato de cálcio. Com P&B12, foi investigado o crescimento de cada microrganismo no meio com polpa e extrato hidrossolúvel da amêndoa do cupuaçu, nas diferentes temperaturas e as melhores combinações de microrganismos para uma maior viabilidade e produção de ácido láctico. As variáveis respostas foram fator de crescimento celular total (CCT) para contagem de leveduras e de lactobacilos, separadamente, ou em na mistura, consumo de açúcares redutores (AR) e consumo de açúcares totais (AT), produção de exopolissacarídeos (EPS) e produção de ácido láctico. Os resultados foram analisados utilizando-se o software STATISTICA 12.0 (StatSoft, 2008).

2.3 FERMENTAÇÃO

Os experimentos foram conduzidos conforme planejamento experimental, em escala laboratorial em tubos fechados contendo 50 mL dos meios preparados. Os meios preparados foram submetidos a uma pasteurização em autoclave a 100°C/4min, resfriados a aproximadamente 45°C e inoculados em condições assépticas com o mix de probióticos.

As fermentações ocorreram sem agitação, em incubadora (Solab modelo SL-223) até pH 4,5 para os ensaios preliminares, e por 8 horas e 12 horas para o P&B12. As amostras foram coletadas em triplicata a cada 4 horas nos ensaios preliminares para estudos cinéticos, e para o P&B12 foram realizadas análises no tempo inicial (tempo 0h) e final (8 e 12h), de contagem total (CT), contagem de leveduras e contagem de Lactobacilos (CL), acidez titulável total (mEq/100mL), pH, açúcares redutores e totais (g/100 mL), exopolissacarídeos (g/L) e produção de ácido láctico (%).

2.3.1 Ensaios Preliminares

Para verificar se os microrganismos conseguiriam fermentar e verificar a viabilidade da fermentação foram realizados pré-testes seguindo o ponto central do planejamento experimental.

2.4 DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DOS PROBIÓTICOS TOTAIS

2.4.1 Contagem Padrão em Placas

Para a Contagem Total (CT) de Lactobacilos, Bifidobactérias e *Saccharomyces boulardii*, foram retiradas amostras de 100µL e transferidas para eppendorffs contendo 900µL de água peptonada (0,01%), a partir dessa primeira diluição foram feitas diluições decimais subsequentes. Para bactérias lácticas Lactobacilos e Bifidobactérias, foi realizado plaqueamento em profundidade (*pour-plate*) em Ágar MRS + 0,1% de azul de anilina e incubadas por 48 horas a 37 °C em condições de aeróbios e anaerobiose, respectivamente, e *S. boulardii* o plaqueamento foi realizado em profundidade (*pour-plate*) em Ágar YPD + 0,1% de azul de anilina incubado por 48h a 28 °C.

As condições de anaerobiose foram obtidas por meio de jarras herméticas e geradores Anaerobac Probac (São Paulo, Brasil). Todas as contagens foram efetuadas em triplicata, e os resultados expressos em Log UFC/mL.

2.5 CARACTERIZAÇÃO DA COMPOSIÇÃO CENTESIMAL DA MATÉRIA-PRIMA

As composições centesimais da polpa de cupuaçu e do extrato de sua amêndoa (Umidade, extrato etéreo, proteína bruta, fibra bruta, cinzas e fração glicídica), foram determinados segundo a metodologia da AOAC (2012).

2.6 ANÁLISES FÍSICO-QUÍMICAS

Para as determinações de pH e acidez, as amostras foram centrifugadas a 9640 g durante 10 min/5 °C para remoção de células. Para as análises de açúcares, EPS e ácidos orgânicos, para cada mL de amostra, foi adicionado 0,01 mL de ácido cítrico 1M, seguido de centrifugação a 9640 g durante 10 min/5 °C para remoção de células e proteínas. (MONDRAGÓN-BERNAL et al., 2017).

2.6.1 Acidez titulável total e pH

O pH e acidez titulável total das amostras, retiradas em diferentes tempos de fermentação, foram determinados segundo a metodologia da AOAC (2012) e expressos em mEq/100mL ou 100g.

2.6.2 Determinação de açúcares redutores e totais

A determinação de açúcares redutores foi realizada usando Método Espectrofotométrico com 3,5-ácido dinitrossalicílico (DNS) (Miller, 1959).

2.7 COR INSTRUMENTAL

A avaliação da cor foi feita por colorimetria Tristimulus, por leitura em colorímetro digital marca Konica-Minolta, CM-5 (Minolta, Osaka, Japão), pelo sistema CIE Lab (CIE, 1986), com referência ao iluminante D65 e um ângulo visual de 10°. As amostras foram posicionadas em uma placa de Petri com diâmetro de 60 mm para a leitura direta dos parâmetros L*, a* e b*, conforme metodologia descrita por Bicho et al. (2012). L* define a luminosidade (L = 0 preto e L = 100 branco), a* e b* são responsáveis pela cromaticidade (+a vermelho e -a verde; +b amarelo e -b azul).

2.8 DETERMINAÇÃO DE EXOPOLISSACARÍDEOS (EPS)

2.8.1 Extração do EPS Bruto

O sobrenadante obtido na separação de células foi aquecido a 100°C por 10min para inativação das enzimas presentes, e centrifugado 2500g por 20min. Os EPS foram precipitados do sobrenadante adicionando-se 5 volumes de etanol absoluto resfriado, e mantido durante 24h a 4°C. Posteriormente centrifugou-se a 2500g por 20min, e o precipitado dissolvido novamente com mais 2 volumes de etanol resfriado, mantidos por mais uma noite a 4°C. Após centrifugou-se novamente a 2500g por 20min, retirou-se o sobrenadante e o pellet foi re-dissolvido em água destilada (1,0mL) (Metodologia adaptada de MONDRAGÓN-BERNAL et al, 2017).

2.8.2 Quantificação de EPS pelo Método de Antrona

Em tubo de ensaio, adicionaram-se 4 mL do reativo de Antrona (0,2 g/100 mL de H₂SO₄) e 1 mL de amostra previamente diluída (0,01-0,1 g/L). Incubaram-se os tubos em banho-maria em ebulição durante 10 minutos e resfriaram-se em banho com gelo. As absorvâncias foram medidas em espectrofotômetro a 600 nm (Silva, 2003). A curva padrão foi

feita utilizando-se dextrana de massa molecular 9300 Da (Metodologia adaptada de MONDRAGÓN-BERNAL et al, 2017).

2.9 DETERMINAÇÃO DE ÁCIDOS ORGÂNICOS

Os ácidos orgânicos foram analisados por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE). Foi utilizado um cromatógrafo da Shimadzu, com sistema de detecção por arranjo de diodos (modelo SPD-M20A), com amostrador automático (SIL-20AHT). Foi utilizada uma coluna Supelcogel C₆₁₀H (30 cm x 7,8 mm x 9,0 µm), equipada com pré-coluna. A fase móvel usada foi o ácido perclórico (70%) diluído em água ultrapura, com fluxo de 0,5 mL min⁻¹ a 40 °C e tempo de corrida de 30 min. Os ácidos foram detectados por um detector UV em 210 nm. A identificação e quantificação dos ácidos foi feita utilizando os respectivos padrões dos ácidos propiônico, tartárico, cítrico, málico, acético e láctico. Todos os padrões apresentavam pureza de 99,9% (Sigma-Aldrich, EUA). As amostras foram diluídas 1/50 e filtradas com filtro de 0,22 µm (Chromafil-Induslab/Curitiba, Paraná/Brasil) para posterior análise (NGOME, 2017). Os resultados foram processados com ajuda do software LC-Solutions.

2.10 TESTES *IN VITRO* DE RESISTÊNCIA DE PROBIÓTICOS ÀS CONDIÇÕES SIMULADAS DO APARELHO DIGESTÓRIO HUMANO

Os testes de resistência ao trato digestório humano dos microrganismos probióticos presentes nos produtos preparados, foram realizados por meio da elaboração por sucos digestivos artificiais e testes simulados *in vitro*. A preparação das soluções estoque de eletrólitos e fluidos digestivos de simulação da fase oral, fase gástrica e fase do intestino delgado, foram realizados conforme metodologia de Mulet-Cabero, et al. (2020), com adaptações.

Todos os sucos digestivos foram esterilizados a frio através de filtração usando membrana de 0,2 µm (Chromafil-Induslab/Curitiba, Paraná/Brasil) em condições assépticas.

2.10.1 Digestão *in vitro*

Foi adicionada uma fração de 1:1 de amostra fermentada em fluido simulado da fase oral (saliva) contendo 150 U/mL da enzima α -amilase (Sigma Aldrich Brasil/Cotia/Brasil), os tubos foram agitados com vortex por 10 segundos e incubados a 37°C por 2min. Foi retirada amostra para plaqueamento e posteriormente adicionada, numa proporção de 1:1 de fluido

simulado da fase gástrica (suco gástrico) com 4.000 U/mL de pepsina e 120 U/mL de lipase (Sigma Aldrich Brasil/Cotia/Brasil), com pH ajustado para 2,0, os tubos foram agitados e incubados por 2 tempos (uma e duas horas) a 37°C, para simular a digestão estomacal. Após as duas horas de incubação, e retiradas amostras para plaqueamento de cada tempo, foi adicionado, a uma proporção de 1:1, o fluido simulado da fase do intestino delgado contendo 200 U/mL de pancreatina (Sigma Aldrich Brasil/Cotia/Brasil) e 20mM de Sais Biliares, e incubado por 2h a 37°C, após o tempo de incubação, foi retirada amostra para posterior plaqueamento. Desta maneira, as amostras foram coletadas em triplicata nos seguintes tempos: dois minutos, uma, duas e quatro horas, e foram realizadas contagens por plaqueamento em profundidade (*pour-plate*) em meios MRS e YPG, para controle da perda de viabilidade dos microrganismos (MONDRAGÓN-BERNAL, 2009; metodologias adaptadas de HERNÁNDEZ-TORRES, 2019; MULET-CABERO et al., 2020).

2.11 TESTE DE HIDROFOBICIDADE

A hidrofobicidade foi testada utilizando o solvente xilol ou xileno. O Xileno é um hidrocarboneto aromático constituído por uma mistura de três isômeros: o-xileno, m-xileno e p-xileno. O xileno comercial contém 20% do isômero orto, 40% do meta e 20% do para, 15% de etilbenzeno e o restante de outros hidrocarbonetos aromáticos (CETESB, 2022).

A hidrofobicidade foi calculada de acordo com a metodologia de Mishra e Prasad (2005). As espécies probióticas utilizadas nos fermentados de cupuaçu foram cultivadas em caldo MRS e YPG a 37 °C por 24h e centrifugadas a 1008g/15min, foram lavadas duas vezes em tampão fosfato 0,1M (pH 7,0) e ressuspensas no mesmo tampão fosfato 0,1M (pH 6,2) para medição da absorbância inicial (A) a 600 nm em espectrofotômetro Biospectro SP-22 (adaptada por HERNÁNDEZ-TORRES, 2019).

Em tubos de ensaio foram colocados 5 mL da suspensão celular em tampão fosfato 0,1M pH 6,2, adicionados de 1ml do hidrocarboneto xileno e misturados com auxílio de agitador tipo vórtex (Vision Scientific KMC-1300V) a alta velocidade durante 2min. Os tubos foram incubados por 1h a 37 °C para permitir a separação das fases. Com auxílio de uma pipeta Pasteur a fase inferior aquosa foi coletada em cubeta de quartzo e foi realizada leitura da absorbância final (A₀) a 600 nm. Quanto menor a absorbância na fase aquosa maior será a hidrofobicidade da superfície celular (H%), calculada utilizando a equação 1 (adaptado por HERNÁNDEZ-TORRES, 2019 de MISHRA; PRASAD, 2005):

$$H\% = \frac{(A-A_0)}{A} \times 100 \quad (1)$$

Onde, A = absorvância inicial, A₀ = absorvância final.

2.12 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Todos os ensaios deste estudo foram realizados em triplicata e os resultados foram submetidos a análises estatísticas de ANOVA e testes de Tukey pelo software STATISTICA 12.0 (StatSoft, 2013). O nível de confiança utilizada foi de 95%.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 COMPOSIÇÃO CENTESIMAL

O cupuaçu (*Theobroma grandiflorum*) é uma fruta ácida e de sabor exótico, abundante em sais minerais (cálcio, fósforo, ferro, potássio, magnésio, sódio e zinco), rico em ácido ascórbico (110mg de vitamina C a 100g de polpa), compostos fenólicos, fibras alimentares e que possui atividade antioxidante (DOS SANTOS et al, 2021). Por seu sabor característico a sua polpa é utilizada para fazer doces, bebidas, geleias, licores, sobremesas e cremes.

O pH típico da polpa do cupuaçu é 3,4, e sua concentração de açúcar é em torno de 10,7°Brix (LIMA et al., 2021). Gondim et al (2001) observou resultados comparáveis, sendo o pH de 3,30, acidez de 2,15g de ácido cítrico/100g e uma concentração de açúcar redutor de 3%.

O cupuaçu também é uma fonte de fibra dietética, em de média de 2,42 g/100g (TBCA, 2011), principalmente fibra solúvel, e contém uma quantidade considerável de amido, bem como polissacarídeos de pectina, conferindo uma textura distinta aos produtos que os incluem do que outras polpas de frutas (RODRIGUES; SILVA; BRITO, 2018; DIAS et al., 2019).

Em termos de produtos químicos voláteis, linalol, a-terpinol, 2-feniletanol, mircenol e linoleno são os principais componentes associados ao aroma floral do cupuaçu (PELAIS, 2014). Pelais (2014), relatou que dióis e metoxi-2,5-dimetil-3(2H)-furano estão associados ao cheiro caracteristicamente incomum do cupuaçu.

Foram realizadas análises físico-químicas para caracterização da polpa e do extrato hidrossolúvel da amêndoa do cupuaçu, os resultados estão apresentados na Tabela 2.3, em base matéria integral.

Tabela 2.3 - Caracterização físico-químicas da polpa e extrato hidrossolúvel da amêndoa do cupuaçu.

Análise	Polpa do Cupuaçu			EHAC		
Umidade (%)	85,84	±	0,10	97,10	±	0,15
Extrato Etéreo (%)	0,23	±	0,08	27,84	±	3,63 ^a
Proteína Bruta (%)	1,44	±	0,05	17,73	±	2,30 ^a
Fibra Bruta (%)	0,87	±	0,03	4,99	±	3,03 ^a
Cinzas (%)	0,81	±	0,03	0,26	±	0,06
Fração Glicídica	10,75	±	0,18	1,27	±	0,21
AR (g/100 mL)	4,57	±	0,14	0,90	±	0,02
AT (g/100 mL)	10,20	±	0,17	2,45	±	0,05
°Brix	13,44	±	0,00	2,45	±	0,00
pH	3,85	±	0,01	5,94	±	0,01
ATT	1,55	±	0,01*	1,33	±	0,06**

Legenda: EHAC- Extrato Hidrossolúvel da Amêndoa do Cupuaçu; a- Base Matéria Seca; AR- Açúcares Redutores; AT- Açúcares Totais; ATT- Acidez Titulável Total; *g de ácido cítrico/100g de polpa; **mEq/100g de extrato hidrossolúvel

Fonte: autoral, 2022.

A análise do teor de umidade é utilizada em muitos processos industriais porque a quantidade de água pode afetar sua vida útil, usabilidade, processabilidade e qualidade (ARAÚJO et al., 2006). Na análise nota-se a polpa do cupuaçu apresentou um teor de umidade de 85,84%, sendo menor que o teor do extrato hidrossolúvel de 97,10%. Segundo a Tabela Brasileira de Composição de Alimentos TACO (2011) e TBCA (2022), o teor de umidade na polpa do cupuaçu é de 86,20%, e para extrato de soja o teor de umidade é de 90,9~91,3%, valores próximos ao encontrados no estudo. Canuto et al. (2010) e Silva et al. (2015), encontraram resultados parecidos, onde obtiveram porcentagens de umidade de 89,2% para polpa de cupuaçu e 98,24~98,92% para o extrato hidrossolúvel da amêndoa do cupuaçu, respectivamente.

O termo extrato etéreo refere-se a qualquer coisa que possa ser extraída em éter. É uma análise que só pode ser feita se não houver umidade na amostra, portanto após secagem e indica o teor de lipídios na amostra. Nas amostras, nota-se que o teor de extrato etéreo é de 0,23% para polpa da fruta, sendo menor que o teor de 27,84% do EHAC. Segundo Rodrigues (2010), o teor lipídico da polpa do cupuaçu é de 0,75%. Para amêndoas despelculadas de cupuaçu, Souza et al. (2020), obtiveram valores de 28,20%.

A “proteína bruta” (PB) refere-se à quantidade total de nitrogênio em uma amostra específica, que inclui tanto o nitrogênio encontrado nas proteínas quanto o nitrogênio encontrado em outros componentes. Foi identificado o teor de 1,44% na polpa do cupuaçu, sendo este menor que o do extrato hidrossolúvel que é 17,73%. Rodrigues (2010) encontrou o

teor proteico de 1,01% para a polpa, e segundo Silva et al., (2018), a proteína bruta para a amêndoa do cupuaçu é de 19,83%.

A obtenção de fibra bruta (FB) requer o uso de ácidos e bases fortes. A extração ácida esgota os amidos, açúcares e porções de pectina e hemicelulose nas amostras. Uma extração simples elimina proteínas remanescentes, pectinas, hemiceluloses e parte de ligninas (ADEBIYI et al., 2017). Foi identificado o teor FB de 0,87% na polpa do cupuaçu, menor que o do extrato hidrossolúvel com 4,99%. Segundo Rodrigues (2010), o teor de fibra bruta na polpa do cupuaçu foi de 0,53%, já Tavares (2022) apontou que o teor de fibras para as amêndoas oscila entre 3,31~3,44%.

O resíduo inorgânico ou resíduo mineral fixo (sódio, potássio, magnésio, cálcio, ferro, fósforo, cobre, cloreto, alumínio, zinco, manganês e outros compostos minerais) remanescente após a combustão da matéria orgânica em altas temperaturas (500-600°C) em uma mufla é referido como o teor de cinzas dos alimentos (MENEZES e PURGATTO, 2016). Neste estudo, foi identificado o teor de cinzas de 0,81% na polpa do cupuaçu e 0,26% no EHAC. Segundo a TBCA (2022), o teor de cinzas da polpa de cupuaçu varia entre 0,64~1,22%, enquanto Souza et al. (2020), encontrou teor de cinzas para as amêndoas despelculadas de 1,86%. Vale ressaltar que o EHAC utilizado neste estudo foi diluído em proporção de 1:6 (água: amêndoa do cupuaçu despelculada), desta maneira o teor de cinza encontrado para amêndoa, desconsiderando a diluição, foi de 1,55%.

A fração glicídica é composta por uma gama de ingredientes como amidos, açúcares, gomas, resinas, ácidos orgânicos e assim por diante (KIMURA, 2003). Observou-se que a fração glicídica na polpa da fruta chegou a 10,75%, valores próximos ao calculado pela TBCA (2022), de 8,09%, e bem maior que 1,27% do extrato hidrossolúvel. Para Souza et al. (2020), a fração glicídica das amêndoas despelculadas é de 6,94%, se fracionado na proporção de 1:6, obtêm-se valores próximos aos encontrados no estudo, cerca de 1,16%.

Os açúcares redutores (ARs) são carboidratos monossacarídeos, como glicose e frutose, por possuírem grupo carbonílico e cetônico livres, capazes de se oxidarem na presença de agentes oxidantes em soluções alcalinas e capazes de causar ganho de elétrons nos sais de cobre, prata e bromo em soluções alcalinas por conterem grupos aldeídos ou cetonas livres e também influenciam no sabor final do produto, cor e textura (SILVA et al., 2003). Nota-se que o teor de AR na polpa da fruta registrou o valor de 4,57%, valores acima do encontrado por Pombo, Medeiros e Pena (2020) (2,62%), enquanto no EHAC foi registrado o valor de 0,90%. Santos Filho e Toro (2020), encontraram 1,21% para amêndoas torradas. Já os açúcares totais (AT) referem-se a soma de todos os AR da amostra. Observou-se que o AT na polpa da fruta

chegou a 10,20%, ficando na faixa obtida por Martim, Neto e Oliveira (2013) (7,45 a 13,73%), além disso, a polpa utilizada atendeu a legislação brasileira, que estipula o valor mínimo de 6,00 g/100 g de açúcares totais para a polpa de cupuaçu (BRASIL, 2018) e no EHAC 2,45%, Santos Filho e Toro (2020) obtiveram para amêndoas torradas valores de AT de 1,32%.

O teor de açúcares pode variar em função do genótipo da variedade e do estágio de maturação dos frutos. Durante o amadurecimento ocorre a degradação dos polissacarídeos presentes na parede celular da baga, como a hidrólise do amido que transforma açúcares complexos em açúcares simples, aplicados para produzir energia no processo respiratório (CHITARRA, CHITARRA, 2005).

Nota-se que o teor de sólidos solúveis (°Brix) na polpa da fruta apresentou o valor de 13,44°Brix, valor próximo ao encontrado por Pombo, Medeiros e Pena (2020) (12,80°Brix), além de atender a legislação pertinente, onde indica que o valor mínimo deve ser de 9,0°Brix (BRASIL, 2018), enquanto no extrato hidrossolúvel foi registrado o valor de 2,45°Brix, valores superiores ao encontrado por Silva et al. (2015) (1,2~1,7°Brix).

O pH determinado nas amostras foi de 3,85 e 5,94, para a polpa da fruta e extrato hidrossolúvel, respectivamente. No estudo de Freire et al. (2009), os autores identificaram pH de 3,45 na polpa do cupuaçu, bem como a fruta utilizada no estudo obedece à legislação vigente, onde estabelece que o pH mínimo para a polpa de cupuaçu de 3,00 (BRASIL, 2018). Santos Filho e Toro (2020) obtiveram resultados de pH 5,66 para amêndoas torradas.

Em relação à acidez total titulável foi obtido o valor de 1,55 g de ácido cítrico/ 100g de polpa da fruta, próximo a valores encontrados por Pombo, Medeiros e Pena (2020) (1,69 g de ácido cítrico/ 100g) e dentro dos valores estabelecidos por lei (1,5g de ácido cítrico/100g) BRASIL, 2018). Para o extrato hidrossolúvel foi obtida acidez de 1,33 mEq/100mL, valores próximos obtidos por Souza et al. (2020) 1,16 meqNaOH N/100 g de amêndoa despelucada.

O rendimento das frutas utilizadas para análise foi de 27,4% para polpa e 19,4% de sementes, sendo o restante, 53,2% de casca mais placenta. Tanssini (2016) estabelece para a polpa de cupuaçu rendimento de 24 a 44% e que as suas sementes correspondem a 20% da massa total do fruto.

3.2 PRÉ-TESTES

Para realização dos testes, foram testados três microrganismos: *Saccharomyces boulardii*-17 (SB), *Bifidobacterium longum* BL04 (BL) e *Lactobacillus rhamnosus* LR32 (LR).

Foram realizados os ensaios preliminares buscando observar a capacidade de fermentação de cada microrganismo e sua viabilidade. Nesta etapa, foram feitos estudos cinéticos de crescimento celular por contagem em plaqueamento por profundidade, de consumo de açúcares redutores e totais, análise de pH e acidez total titulável.

Os resultados obtidos nesta etapa estão apresentados a seguir.

Tabela 2.4 - Cinética de crescimento de células em meio contendo polpa de cupuaçu e EHAC – Contagem total (CT).

Tempo (h)	SB		BL		LR	
	CT		CT		CT	
	Log UFC.mL ⁻¹		Log UFC.mL ⁻¹		Log UFC.mL ⁻¹	
0	5,1 ± 0,06	C, a	4,7 ± 0,08	D, a	4,5 ± 0,65	D, a
4	5,1 ± 0,13	C, a	4,7 ± 0,07	D, b	4,5 ± 0,25	D, b
8	7,2 ± 0,54	B, a	6,4 ± 0,27	A, B, b	5,7 ± 0,13	C, c
12	7,6 ± 0,10	A, B, a	6,5 ± 0,14	A, b	7,6 ± 0,02	A, a
16	8,2 ± 0,65	A, a	6,2 ± 0,02	B, c	7,2 ± 0,04	A, b
20	7,8 ± 0,37	A, B, a	5,2 ± 0,06	C, c	6,5 ± 0,02	B, b
24	7,0 ± 0,69	B, a	4,7 ± 0,10	D, b	6,3 ± 0,39	B, C, a

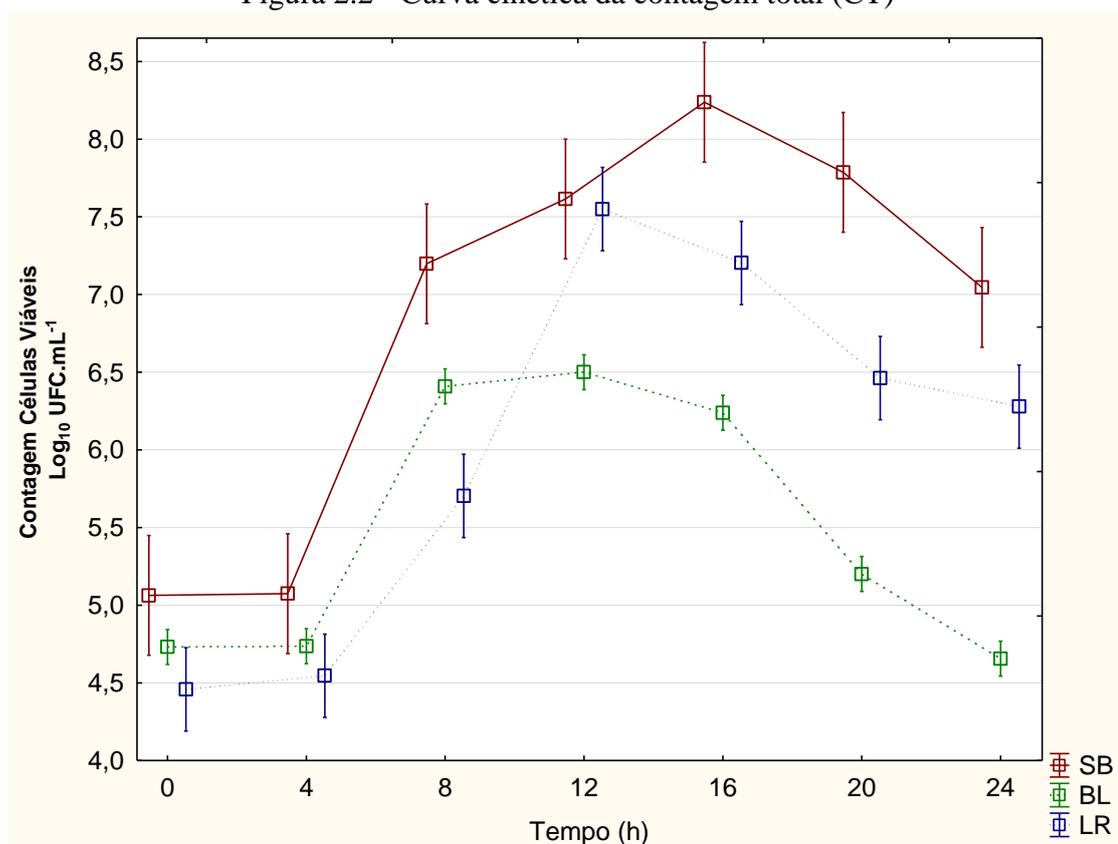
Legenda: EHAC- Extrato Hidrossolúvel da Amêndoa do Cupuaçu; SB- *Saccharomyces boulardii*; BL- *Bifidobacterium longum*; LR- *Lactobacillus rhamnosus*; UFC- Unidade Formadora de Colônias; CT- Contagem Total; A, B,...- Letras maiúsculas diferentes nas colunas indicam diferença estatística pelo teste de Tukey (P<0,05); a, b,...- Letras minúsculas diferentes nas linhas indicam diferença estatística pelo teste de Tukey (P<0,05); Letras iguais não diferem entre si significativamente.

Fonte: Autoral, 2022.

Os dados da Tabela 2.4, representados na Figura 2.2, como a população probiótica em função do tempo de fermentação, permitem ter uma ideia do comportamento de cada espécie no meio fermentativo percebe-se que todos os probióticos aqui estudados apresentaram bom crescimento no meio, e que as maiores contagens totais deram-se nos tempos de 12h e 16h, sendo o maior valor de 8,2 LogUFC.mL⁻¹ na contagem do microrganismo SB. Verificou-se que a linhagem da *L. rhamnosus* cresceu mais lentamente até 8h de fermentação do que as outras linhagens, e que após este tempo ocorreu o aumento de aproximadamente 2 ciclos logarítmicos nas contagens, atingindo seu pico de crescimento em 12h (7,6 LogUFC.mL⁻¹). Nota-se também que após 16h de fermentação, as contagens totais diminuiram nas três cinéticas.

Também percebe-se que no tempo de 12h as contagens de SB e LR foram iguais (7,6 Log UFC.mL⁻¹) e BL obteve nesse tempo a sua maior contagem (6,5 Log UFC.mL⁻¹), após 12 horas decresceu. Diversos fatores podem ter limitado o rendimento e consequentemente a produção de biomassa da *B. longum*, entre eles a baixa concentração de açúcares, proteínas biodisponíveis e pH do meio.

Figura 2.2 - Curva cinética da contagem total (CT)



Legenda: SB- *Saccharomyces boulardii*; BL- *Bifidobacterium longum*; LR- *Lactobacillus rhamnosus*; UFC- Unidade Formadora de Colônias; h- Horas.

Fonte: autoral, 2022.

Pode-se observar na Figura 2.2, que a partir de 4h de fermentação, SB teve crescimento maior em relação aos outros microrganismos, entre 4h e 16h, e após esse tempo mostrou decréscimo. Também nota-se que LR obteve uma fase exponencial a partir de 4h, e alcançou seu ápice pouco após as 12h. Já BL apresentou sua fase exponencial entre 4h e 12h, entrando em fase decrescente a partir deste tempo.

Observando a Tabela 2.5, nota-se que a variação do pH das amostras apresentou comportamento similar para cada uma das fermentações, diminuindo com o decorrer do tempo, sendo que o menor pH registrado foi de 4,33 com o microrganismo BL. Para vida útil de bebidas probióticas aponta-se que valores de pH menores de 4,5 sejam os ideais. Todavia, valores como os encontrados em SB e LR (4,57 e 4,62, respectivamente) ainda estão próximos aos ideais (BARBOSA e GALINA, 2017).

Tabela 2.5 - Alteração de pH ao longo da fermentação de meio contendo polpa de cupuaçu e EHAC com probióticos.

Tempo (h)	SB				BL				LR			
	pH				pH				pH			
0	6,83	±	0,18	A, a	6,91	±	0,13	A, a	7,07	±	0,02	A, a
4	6,67	±	0,16	A, a	6,87	±	0,11	A, a	6,80	±	0,03	B, a
8	6,60	±	0,09	A, a, b	6,35	±	0,22	B, b	6,74	±	0,01	B, a
12	5,68	±	0,07	B, a	5,16	±	0,11	C, b	5,84	±	0,04	C, a
16	4,88	±	0,06	C, b	4,75	±	0,06	D, b	5,06	±	0,04	D, a
20	4,78	±	0,03	C, D, a	4,62	±	0,09	D, E, b	4,74	±	0,01	E, a, b
24	4,57	±	0,03	D, a	4,33	±	0,02	E, b	4,62	±	0,03	F, a

Legenda: EHAC- Extrato Hidrossolúvel da Amêndoa do Cupuaçu; SB- *Saccharomyces boulardii*; BL- *Bifidobacterium longum*; LR- *Lactobacillus rhamnosus*; A, B,...- Letras maiúsculas diferentes nas colunas indicam diferença estatística pelo teste de Tukey (P<0,05); a, b,...- Letras minúsculas diferentes nas linhas indicam diferença estatística pelo teste de Tukey (P<0,05); Letras iguais não diferem entre si significativamente.

Fonte: autoral, 2022

Verificou-se consumo de substratos e geração de metabólitos basicamente ácidos orgânicos. Os açúcares próprios do meio fermentativo foram consumidos nas 24h de fermentação de cada uma das bebidas formuladas, e convertidos em ácidos orgânicos, causando queda do pH.

O valor de pH do meio diminuiu ao longo da fermentação para os três microrganismos. A partir dos dados apresentados na Tabela 2.6, nota-se que a ATT cresceu nas amostras com os três microrganismos analisados, sendo que o maior valor da acidez foi de 5,13 mEq/100mL para BL e o menor foi de 4,00 mEq/100mL para SB.

Tabela 2.6 - Análise da acidez titulável total.

Tempo (h)	SB				BL				LR			
	ATT mEq/100mL				ATT mEq/100mL				ATT mEq/100mL			
0	0,00	±	0,00	D, a	0,00	±	0,00	D, a	0,00	±	0,00	E, a
4	0,00	±	0,00	D, a	0,00	±	0,00	D, a	0,00	±	0,00	E, a
8	0,13	±	0,06	D, a	0,63	±	0,45	D, a	0,13	±	0,06	E, a
12	0,83	±	0,25	C, b	2,00	±	0,20	C, a	1,13	±	0,23	D, b
16	2,00	±	0,53	B, b	3,20	±	0,35	B, a	2,20	±	0,20	C, b
20	2,27	±	0,12	B, b	4,73	±	0,64	A, a	3,00	±	0,20	B, b
24	4,00	±	0,20	A, b	5,13	±	0,42	A, a	4,13	±	0,31	A, b

Legenda: SB- *Saccharomyces boulardii*; BL- *Bifidobacterium longum*; LR- *Lactobacillus rhamnosus*; ATT- Acidez Titulável Total; mEq/100mL meio fermentado; A, B,...- Letras maiúsculas diferentes nas colunas indicam diferença estatística pelo teste de Tukey (P<0,05); a, b,...- Letras minúsculas diferentes nas linhas indicam diferença estatística pelo teste de Tukey (P<0,05); Letras iguais não diferem entre si significativamente.

Fonte: autoral, 2022.

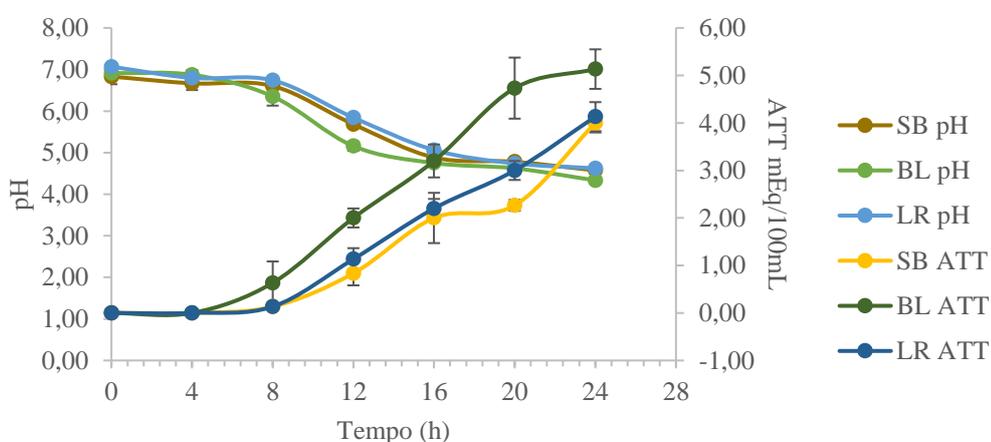
A acidez é uma característica importante da qualidade de um produto. Segundo Chim; Zambiasi; Rodrigues (2013), as reações envolvidas na decomposição, como hidrólise, oxidação

e fermentação de açúcares, geram compostos ácidos que, por consequência, reduzem o pH do meio. Portanto, os ácidos orgânicos produto do metabolismo dos probióticos durante a fermentação são evidência do crescimento celular e consumo dos substratos por parte dos probióticos utilizados.

A partir dos dados apresentados na Tabela 2.6, é possível perceber que a ATT das três amostras sofreu aumento somente após 4h, sendo que BL não somente registrou o maior ATT no período, como também teve sua curva mais acentuada que as demais, no entanto, as contagens para BL não foram as mais altas, mostrando que os produtos da fermentação não são possivelmente associados ao crescimento de BL.

A Figura 2.3 apresenta as curvas de variação de pH e de acidez total titulável ao longo das fermentações. Percebe-se que, nas três cinéticas, como esperado, o pH diminui com o decorrer do tempo, e a ATT, inversamente, aumenta. Além disso, percebe-se que SB e LR obtiveram o mesmo valor de pH em no tempo de 20h, enquanto BL em 16h.

Figura 2.3 - Cinéticas de pH x ATT ao longo de 24h de fermentação de polpa de cupuaçu e EHAC por probióticos.



Legenda: EHAC- Extrato Hidrossolúvel da Amêndoa do Cupuaçu; SB- *Saccharomyces boulardii*; BL- *Bifidobacterium longum*; LR- *Lactobacillus rhamnosus*; ATT- Acidez Titulável Total; mEq/100mL meio fermentado;

Fonte: autoral, 2022.

Mediante os dados da Tabela 2.7, é possível identificar que o AT nos meios fermentados diminuiu com o decorrer do tempo, tendendo a se estabilizar a entre 16 e 20h. A fermentação com SB registrou a menor concentração de açúcares totais depois de 24h, (0,79g AT/100mL), seguindo da fermentação com LR (1,84g AT/100mL) e com BL (2,51g AT/100mL). Além disso, em relação aos açúcares totais, nas fermentações com SB e LR, houve maiores consumos reduzindo de 5,07 a 0,79g AT/100mL e 6,01 a 1,84g AT/100mL,

respectivamente, que na fermentação com BL (de 4,75 a 2,51g AT/100mL). Nota-se que a concentração de açúcares totais diminuiu simultaneamente ao crescimento celular. A partir das 16h, a taxa do consumo de açúcares totais desacelerou conforme o declínio de crescimento dos microrganismos.

Tabela 2.7 - Cinética de consumo de açúcares totais em meio fermentado a base de polpa de cupuaçu e EHAC por probióticos.

Tempo (h)	SB		BL		LR				
	AT - g AT/ 100 mL		AT - g AT/ 100mL		AT - g AT/ 100mL				
0	5,07	± 0,75	A, a	4,75	± 0,64	A, a	6,01	± 0,69	A, a
4	4,69	± 0,90	A, a	4,66	± 0,45	A, a	5,02	± 0,44	A, a
8	4,13	± 0,31	A, B, a	4,42	± 0,17	A, B, a	5,02	± 0,89	A, a
12	2,78	± 0,69	B, C, a	3,18	± 0,74	A, B, C, a	3,44	± 0,63	B, a
16	1,86	± 0,36	C, D, b	3,09	± 0,71	A, B, C, a	1,97	± 0,05	B, C, a, b
20	1,77	± 0,08	C, D, a	2,71	± 0,71	B, C, a	1,95	± 0,50	B, C, a
24	0,79	± 0,23	D, b	2,51	± 0,68	C, a	1,84	± 0,10	C, a

Legenda: EHAC- Extrato Hidrossolúvel da Amêndoa do Cupuaçu; AT- Açúcares Totais; A, B,...- Letras maiúsculas diferentes nas colunas indicam diferença estatística pelo teste de Tukey (P<0,05); a, b,...- Letras minúsculas diferentes nas linhas indicam diferença estatística pelo teste de Tukey (P<0,05); Letras iguais não diferem entre si significativamente.

Fonte: autoral, 2022.

A partir dos dados apresentados na Tabela 2.8, nota-se que o comportamento dos AR foi semelhante ao dos AT. As menores concentrações finais de AR foram obtidas em SB (0,53 g AR/100mL), BL (1,42 g AR/100mL) e por fim LR (1,84 g AR/100mL). A fermentação com SB apresentou maior consumo de AR. À medida que AR foram sendo consumidos, houve uma diminuição do pH, devido à formação de ácidos orgânicos.

Tabela 2.8 - Análise de consumo de açúcares redutores.

Tempo (h)	SB		BL		LR				
	AR - g AR/ 100 mL		AR - g AR/100 mL		AR - g AR/100 mL				
0	3,33	± 0,10	A, a	2,57	± 0,12	A, a	2,96	± 0,53	A, a
4	3,04	± 0,44	A, a	2,54	± 0,41	A, a	2,70	± 0,17	A, B, a
8	2,75	± 0,04	A, a	2,41	± 0,33	A, a	2,32	± 0,28	A, B, a
12	2,57	± 0,46	A, a	2,07	± 0,27	A, B, a	2,12	± 0,18	A, B, a
16	1,69	± 0,37	B, a	1,98	± 0,37	A, B, a	1,97	± 0,17	B, a
20	1,45	± 0,04	B, a	1,84	± 0,29	A, B, a	1,95	± 0,54	B, a
24	0,53	± 0,18	C, b	1,42	± 0,33	B, a	1,84	± 0,20	B, a

Legenda: AR- Açúcares Redutores; A, B,...- Letras maiúsculas diferentes nas colunas indicam diferença estatística pelo teste de Tukey (P<0,05); a, b,...- Letras minúsculas diferentes nas linhas indicam diferença estatística pelo teste de Tukey (P<0,05); Letras iguais não diferem entre si significativamente.

Fonte: autoral, 2022.

A partir destes resultados preliminares, observou-se que o microrganismo *B. longum* (BL) teve a menor taxa de crescimento em comparação aos outros dois microrganismos.

Ao contrário das bactérias, bolores e leveduras podem sobreviver em ambientes de baixo pH. Alguns bolores e leveduras podem crescer alimentos com pH baixo, assim como algumas bactérias lácticas também suportam, como, por exemplo, os lactobacilos. Dentre as bifidobactérias, *B. longum* é a espécie mais resistente a pHs baixos.

Valores baixos de pH são ideais para o objetivo deste estudo, principalmente inferiores a 4,5, uma vez que pH baixos garantem a qualidade microbiológica das bebidas com relação à presença de células viáveis de *C. botulinum*¹, já que, a alta acidez das bebidas não permite que ocorra a germinação dos esporos evitando desta forma que ocorra a produção de toxinas letais (BRASIL, 2006).

Como as melhores taxas de crescimento obtidas foram com os microrganismos *L. rhamnosus* (LR) e *S. boulardii* (SB), estes foram escolhidos para a etapa seguinte.

Os dados das curvas cinéticas apresentadas possibilitaram a determinação do tempo de fermentação ideal, sendo o melhor tempo identificado de 12 horas (Figura 2.2), tendo este tempo como referência para a realização dos próximos testes.

3.3 RESULTADOS DO P&B12

Nesta etapa, foi utilizado o planejamento Plackett-Burmann 12 (P&B12), com os microrganismos *Lactobacillus rhamnosus* (LR) e *Saccharomyces boulardii* (SB).

Buscou-se determinar qual microrganismo ou se a combinação LR/SB possui maior capacidade de fermentação, produção de exopolissacarídeos (como agente de viscosidade produzido *in situ*, e, como fonte de fibras solúveis), consumo de açúcares e de produção metabólicos pós-bióticos, como produção de ácido lático, ácido acético e/ou outros ácidos graxos de cadeia curta (AGCC).

Os resultados obtidos estão apresentados na Tabela 2.9. Nota-se que, em relação ao aumento da população microbiana (calculada como a diferença entre a contagem final e inicial) no tempo de 8h de fermentação houve variação entre 0,9~2,8 ciclos logarítmicos, e no tempo de 12h de fermentação os diferenciais no crescimento variou entre 0,9~2,6 ciclos log. Dentre as combinações avaliadas, embora as maiores contagens finais de cada período estejam nos ensaios 16 (8h, valor de 9,1 Log UFC.mL⁻¹) e 5 (12 h, valor de 9,5 Log UFC.mL⁻¹), os melhores

¹É uma bactéria anaeróbia produtora de esporos encontrada em uma variedade de ambientes, incluindo solo, sedimentos marinhos, água doce e trato digestivo de humanos e animais. Potencial redox, pH, temperatura e umidade inadequados no local de trabalho podem facilitar seu crescimento, o que pode resultar na formação de uma toxina.

resultados de crescimento foram encontrados no ensaio 7, fermentado somente com SB, com aumento no crescimento de 2,8 ciclos log em 8h de fermentação, seguido dos ensaios 2 (2,7 Log UFC.mL⁻¹) fermentado com LR, 3 (2,0 Log UFC.mL⁻¹) e 9 (2,1 Log UFC.mL⁻¹) estes dois últimos fermentados com SB.

De Paula et al. (2021), obteve crescimento de 1,3 ciclos logarítmicos utilizando cepas de *Saccharomyces cerevisiae* var. *boulardii* no desenvolvimento de cerveja de trigo probiótica, em quase 30 horas de fermentação. Observando os ensaios de 2 a 12, onde foram inoculados os meios fermentativos com probióticos puros, em 8h de fermentação CCT variou de 1,2 a 2,8, e em 12h, ensaios de 1 a 9 e 11, a CCT variou de 1,2 a 2,6 Log UFC.mL⁻¹, demonstrando que o meio a base de polpa e extrato de cupuaçu resulta em uma opção não convencional para o mercado de bebidas funcionais para públicos veganos em geral.

As menores taxas de crescimentos são observadas nos ensaios do ponto central do planejamento experimental (13 a 16), ou seja, aqueles contendo proporções iguais de *Lactobacillus rhamnosus* LR32 (LR) e *Saccharomyces boulardii*-17 (SB) (proporção 50:50) e, durante o processo de fermentação. Podem ocorrer várias interações entre a bactéria láctica (BAL) e a levedura, no entanto, não foi observada simbiose entre as espécies, ao contrário, percebe-se uma inibição exercida entre os microrganismos.

Saccharomyces é um gênero de leveduras que pode exercer inibições sobre as Bactérias Ácido Lácticas (BAL). Isso ocorre porque as leveduras consomem os açúcares presentes no ambiente e produzem álcool e dióxido de carbono como subprodutos. Essa produção de álcool pode afetar o crescimento e a sobrevivência de bactérias que são sensíveis ao álcool. Por essas razões, *Saccharomyces* pode ser considerado um agente inibidor natural de algumas bactérias, incluindo algumas Bactérias Ácido Lácticas (GUIMARÃES et al., 2019)

As Bactérias Ácido Lácticas (BAL) também podem exercer inibições sobre *Saccharomyces*, dependendo das condições do ambiente em que as duas espécies estão presentes. Cherubin (2003), levanta alguns estudos dessas inibições exercidas pelas BAL sobre a levedura, o autor cita que muitas espécies de bactérias são capazes de secretar inibidores como cicloheximida, cloranfenicol, nistatina, entre outros compostos, utilizados em medicamentos para inibir o crescimento de leveduras; relata também que as BAL produzem peptídeos com a função de executar a comunicação célula-célula e exercer atividade antimicrobiana.

Além disso, algumas BAL podem produzir compostos antimicrobianos, como bacteriocinas, que são capazes de inibir o crescimento de outras bactérias e leveduras. Por essas razões, a presença de BAL em um ambiente fermentativo pode afetar o crescimento e a sobrevivência de *Saccharomyces* e outras leveduras. No entanto, muitos fatores podem

influenciar a relação entre essas espécies, incluindo a composição do meio de cultura, a temperatura, a concentração de açúcares e outros nutrientes, e a relação numérica entre as espécies (LEROY; DE VUYST, 2014).

De acordo com a Tabela 2.9, foram realizados 16 ensaios de fermentação e a contagem dos microrganismos e crescimento celular foram registrados após 8 e 12 horas de fermentação. As letras maiúsculas diferentes nas colunas indicam diferença estatística pelo teste de Tukey ($P < 0,05$). As letras iguais indicam que não há diferença estatística significativa entre as respostas.

Analisando a tabela, para 8h de fermentação, podemos observar que os ensaios 2 e 7 apresentaram as maiores contagens finais de microrganismos (2,7 e 2,8 logUFC.mL⁻¹, respectivamente) e, portanto, foram os ensaios com maior crescimento celular. Além disso, o ensaio 2 apresentou a menor variação (0,1 logUFC.mL⁻¹) em relação à contagem final, indicando um resultado mais consistente.

Os ensaios 4, 8, 10, 11 e 12 apresentaram respostas estatisticamente iguais (letras B, C e D), indicando que não há diferença significativa entre as contagens finais nesses ensaios. Por outro lado, o ensaio 2 apresentou uma resposta estatisticamente diferente das outras, indicando que o crescimento nesse ensaio foi significativamente maior do que nos outros ensaios.

Na mesma tabela, observa-se que os ensaios 1, 2, 3, 5, 7 e 9 apresentaram as maiores contagens finais de microrganismos após 12 horas de fermentação, indicando um maior crescimento celular nesses ensaios. Esses ensaios apresentam letras maiúsculas iguais em suas contagens finais, indicando que não há diferença significativa entre eles quanto ao crescimento.

Por outro lado, os ensaios 4, 6, 8, 10, 11, 12, 13, 14, 15 e 16 apresentaram contagens finais menores, indicando um menor crescimento celular nesses ensaios. Esses ensaios apresentam letras maiúsculas diferentes em relação aos ensaios com as maiores contagens finais, indicando diferenças significativas entre eles quanto ao crescimento.

Já em relação ao ensaio 7, em 8h de fermentação, não é possível afirmar com certeza se a resposta é diferente ou igual às dos outros bons ensaios (2 e 3) com base apenas na tabela. Isso porque a contagem final (CF) desse ensaio apresentou uma grande variação (0,4 logUFC.mL⁻¹) em relação às outras contagens finais, o que indica uma maior incerteza nos resultados. Enquanto em 12h de fermentação, ele apresentou um crescimento celular total (CCT) significativamente maior do que os ensaios com as menores contagens finais (ensaios 4, 6, 8, 10, 11, 12, 13, 14, 15 e 16), porém apresenta uma letra maiúscula diferente em relação aos ensaios com as maiores contagens finais (ensaios 1, 2, 3, 5 e 9). Isso indica que, embora o

crescimento celular (CCT), após 12h de fermentação, tenha sido maior em comparação aos ensaios com as menores contagens finais (CF), ele ainda pode ser considerado igual a eles quanto ao crescimento (CT), uma vez que não apresenta diferença em relação a eles. Já em relação aos ensaios com as maiores contagens finais, o ensaio 7 apresenta diferença significativa quanto ao crescimento celular.

No entanto, é importante notar que os ensaios foram realizados em triplicata e que as letras iguais indicam que as médias de crescimento celular total não diferem significativamente entre si.

Em resumo, com base nos resultados da tabela e nos testes estatísticos realizados, podemos concluir que os ensaios 2, 3, 5, 7 e 9 apresentaram as maiores médias de crescimento celular total, enquanto os demais ensaios apresentaram menores médias de CCT.

Tabela 2.9 - Contagem dos microrganismos e crescimento celular durante a fermentação dos ensaios realizados do delineamento P&B12.

Ensaio	Tempos de Fermentação																
	0h			8h						12h							
	CI			CF*			CCT = [CF* - CI]			CF**			CCT = [CF** - CI]				
	Log UFC.mL ⁻¹			Log UFC.mL ⁻¹			Log UFC.mL ⁻¹			Log UFC.mL ⁻¹			Log UFC.mL ⁻¹				
1	5,5	±	0,2	6,5	±	0,3	1,0	±	0,3	D, b	7,4	±	0,1	1,9	±	0,3	B, C, D, E, a
2	3,7	±	0,1	6,4	±	0,2	2,7	±	0,1	A, a	5,7	±	0,2	2,0	±	0,1	B, C, D, b
3	4,2	±	0,1	6,2	±	0,0	2,0	±	0,1	B, a	6,2	±	0,0	2,0	±	0,1	B, C, D, E, a
4	4,2	±	0,0	5,4	±	0,0	1,2	±	0,0	C, D, a	5,4	±	0,0	1,2	±	0,1	F, a
5	7,4	±	0,0	9,1	±	0,1	1,7	±	0,2	B, b	9,5	±	0,2	2,1	±	0,2	B, a
6	6,2	±	0,2	7,9	±	0,2	1,7	±	0,0	B, a	7,9	±	0,3	1,7	±	0,1	D, E, a
7	3,7	±	0,1	6,5	±	0,4	2,8	±	0,4	A, a	6,2	±	0,1	2,6	±	0,0	A, a
8	4,9	±	0,0	6,5	±	0,0	1,6	±	0,0	B, C, b	6,6	±	0,1	1,7	±	0,1	C, D, E, a
9	3,6	±	0,0	5,4	±	0,1	1,9	±	0,1	B, b	5,6	±	0,0	2,1	±	0,0	B, C, a
10	5,4	±	0,1	6,6	±	0,0	1,2	±	0,1	C, D, a	6,4	±	0,3	1,0	±	0,3	F, a
11	3,7	±	0,1	5,2	±	0,1	1,5	±	0,1	B, C, a	5,3	±	0,0	1,6	±	0,1	E, a
12	4,4	±	0,1	5,5	±	0,1	1,2	±	0,1	C, D, a	5,3	±	0,1	1,0	±	0,0	F, b
13	8,2	±	0,0	9,1	±	0,0	1,0	±	0,1	D, a	9,1	±	0,0	1,0	±	0,1	F, a
14	8,2	±	0,1	9,1	±	0,1	1,0	±	0,1	D, a	9,0	±	0,0	0,9	±	0,1	F, a
15	8,2	±	0,0	9,1	±	0,1	1,0	±	0,1	D, a	9,1	±	0,0	0,9	±	0,1	F, a
16	8,2	±	0,0	9,1	±	0,1	1,0	±	0,1	D, a	9,1	±	0,0	0,9	±	0,0	F, a

Legenda: UFC- Unidade Formadora de Colônias; CCT- Crescimento Celular Total; CI- Contagem Inicial; CF*- Contagem Final (8h); CF**- Contagem Final (12h); A, B,...- Letras maiúsculas diferentes nas colunas indicam diferença estatística pelo teste de Tukey (P<0,05); a, b,...- Letras minúsculas diferentes nas linhas indicam diferença estatística pelo teste de Tukey (P<0,05); Letras iguais não diferem entre si significativamente.

Fonte: autoral, 2022.

Na tabela 2.10 são apresentados os dados de AT das fermentações realizadas para o P&B12. Nota-se que, no tempo 8h, o maior consumo de AT foi registrado no ensaio 7 (13,3 g AT/100 mL) com concentração final de 84,1 g AT/100 mL e o menor foi registrado no ensaio 2 (0,2 g AT/100 mL) sendo de 35,9 g AT/100 mL após 8h de fermentação. Tal comportamento pode ser explicado pela composição do meio fermentativo, uma vez que, de acordo com a formulação realizada pelo P&B12 (Tabela 2.1), o ensaio 7 foi elaborado com 75% de polpa de cupuaçu e 8% de sacarose, enquanto o ensaio 2, 45% de polpa e 0% de sacarose, desta maneira, o ensaio 7 possuía mais carboidratos para serem consumidos pelos microrganismos inoculados.

No tempo 12h destacou-se o ensaio 5, que obteve a maior queda de AT em 30,18 e sua concentração final de 60,21 g AT/100 mL e o ensaio 2 com menor queda de AT em 0,47 g AT/100mL e sua concentração final em 35,68 g AT/100 mL.

A partir da tabela 2.10, onde apresentados os dados de AT das fermentações realizadas para o P&B12, é possível observar que os ensaios apresentaram diferentes consumos de açúcares totais após 8 horas de fermentação. Os resultados indicam que os ensaios 5, 7, 9, 15 e 16. Esses ensaios podem ser considerados os mais eficientes na fermentação dos açúcares presentes no meio.

Na condição de 12 horas de fermentação, os ensaios 5, 6, 7, 9, 13, 14, 15 e 16 apresentaram os maiores consumos de açúcares totais, superiores a 20 g/100 mL. Destes, os ensaios 5, 13, 14, 15 e 16 foram estatisticamente diferentes entre si. Já os ensaios 6, 7 e 9 apresentaram valores médios semelhantes. Mais um vez demonstrando que quanto maior a concentração de carboidratos no meio, maior será o consumo de açúcares totais pelos microrganismos adicionados, uma vez que esses ensaios possuíam a maiores taxas de polpa e extrato hidrossolúvel do cupuaçu, teor de sacarose e teor de farinha de arroz.

Por outro lado, os ensaios 2, 3, 8, 10, 11 e 12 apresentaram os menores consumos de açúcares totais, inferiores a 10 g/100 mL. Destes, apenas o ensaio 2 foi estatisticamente diferente dos demais.

É importante ressaltar que os resultados da análise de açúcares totais podem ser influenciados por fatores como a composição do meio de cultura utilizado, o tipo e quantidade de microrganismos empregados, a temperatura e o tempo de fermentação. Portanto, é fundamental considerar esses fatores na interpretação dos resultados obtidos.

Tabela 2.10 - Análise de açúcares totais durante a fermentação dos ensaios realizados do delineamento P&B12.

Ensaio	Tempos de Fermentação														
	0h			8h						12h					
	AT I			AT F*			Consumo AT			AT F**			Consumo AT		
	g AT/100 mL		g AT/100 mL		[I – F*] g AT/100 mL		g AT/100 mL		g AT/100 mL		[I – F**] g AT/100 mL				
1	62,4	± 3,0	56,6	± 4,1	5,8	± 0,8	A, B, C, a	55,2	± 0,6	7,2	± 1,9	D, E, a			
2	36,4	± 1,0	35,9	± 0,5	0,2	± 1,0	C, a	35,7	± 0,3	0,5	± 1,1	E, a			
3	89,1	± 5,7	87,8	± 1,1	1,3	± 3,4	C, a	87,7	± 6,8	1,4	± 0,7	E, a			
4	91,8	± 0,2	89,5	± 0,2	2,3	± 0,2	B, C, a	86,0	± 3,7	5,8	± 2,7	D, E, a			
5	90,4	± 5,7	82,4	± 0,0	8,0	± 4,2	A, B, C, b	60,2	± 0,2	30,2	± 4,1	A, a			
6	108,3	± 1,8	102,1	± 4,0	6,2	± 1,6	A, B, C, a	94,5	± 0,7	13,7	± 1,1	B, C, D, E, a			
7	97,4	± 0,7	84,1	± 0,9	13,3	± 1,2	A, a	80,2	± 0,9	17,2	± 1,0	A, B, C, D, a			
8	92,0	± 5,1	88,3	± 1,5	3,6	± 2,6	A, B, C, a	83,8	± 0,9	8,2	± 3,0	D, E, a			
9	100,0	± 7,0	87,5	± 1,1	12,4	± 4,2	A, B, a	83,7	± 2,6	16,3	± 3,1	A, B, C, D, a			
10	83,0	± 1,3	81,5	± 2,8	1,6	± 1,7	C, a	74,2	± 0,6	8,8	± 1,2	C, D, E, a			
11	61,1	± 0,7	58,5	± 2,2	2,6	± 1,9	A, B, C, a	55,8	± 0,9	5,3	± 1,2	D, E, a			
12	38,7	± 0,3	36,4	± 2,1	2,4	± 1,6	B, C, a	32,9	± 1,1	5,8	± 0,9	D, E, a			
13	79,9	± 1,7	72,9	± 5,0	6,9	± 4,7	A, B, C, a	51,1	± 10,1	28,7	± 6,0	A, a,			
14	79,9	± 8,7	71,7	± 3,4	6,6	± 7,7	A, B, C, a	52,0	± 7,1	26,3	± 3,6	A, B, a			
15	79,9	± 1,4	73,0	± 0,9	7,7	± 0,9	A, B, C, b	54,8	± 3,1	25,9	± 1,2	A, B, a			
16	79,9	± 0,3	71,4	± 0,5	7,9	± 0,3	A, B, C, a	55,9	± 7,7	23,4	± 5,2	A, B, C, a			

Legenda: AT- Açúcares Totais; I- Tempo Inicial (0h); F*- Tempo Final (8h); F** - Tempo Final (12h); [I – F]- [Tempo Inicial – Tempo Final]; A, B,...- Letras maiúsculas diferentes nas colunas indicam diferença estatística pelo teste de Tukey (P<0,05); a, b,...- Letras minúsculas diferentes nas linhas indicam diferença estatística pelo teste de Tukey (P<0,05); Letras iguais não diferem entre si significativamente.

Fonte: autoral, 2022.

De acordo com a Tabela 2.11, os ensaios apresentaram diferenças significativas no consumo de açúcares redutores, indicadas pelas letras maiúsculas diferentes nas colunas, pelo teste de Tukey com $p < 0,05$. Os ensaios 4, 6 e 7 apresentaram os maiores consumos de açúcares redutores em 8 horas de fermentação, com médias de 5,72 g AR/100 mL, 5,20 g AR/100 mL e 5,20 g AR/100 mL, respectivamente, indicados pela letra A na tabela.

Os ensaios 8 e 9 também apresentaram um consumo significativamente diferente em relação aos demais ensaios, com médias de 11,96 g AR/100 mL e 9,02 g AR/100 mL, respectivamente, indicados pela letra B na tabela.

Os ensaios 1, 3, 5, 10, 11, 12, 13, 14, 15 e 16 apresentaram médias de consumo de açúcares redutores inferiores aos ensaios com as maiores médias, e foram indicados pelas letras C na tabela.

É importante notar que o consumo de açúcares redutores não é necessariamente igual ao consumo de açúcares totais, conforme observado na Tabela 2.10. É possível que um ensaio apresente um alto consumo de açúcares redutores, mas um baixo consumo de açúcares totais, dependendo da composição dos açúcares presentes na solução de fermentação.

Após 12 horas de fermentação, observando os resultados, pode-se notar que os ensaios que tiveram os maiores consumos de açúcares redutores foram o ensaio 6, com 22,20 g AR/100 mL, seguido pelos ensaios 13, com 17,80 g AR/100 mL, e 15, com 16,45 g AR/100 mL. Esses três ensaios apresentaram respostas estatisticamente diferentes dos demais ensaios, indicados pelas letras maiúsculas diferentes.

Além disso, os ensaios 4 e 5, com 12,14 e 11,62 g AR/100 mL, respectivamente, apresentaram respostas estatisticamente diferentes dos ensaios 8, com 13,53 g AR/100 mL, e 14, com 12,88 g AR/100 mL, indicados pelas letras maiúsculas diferentes.

Já os ensaios 1, 2, 3, 7, 9, 10, 11, 12, e 16 não apresentaram diferença estatística significativa em relação aos outros ensaios, indicados pelas letras iguais.

Portanto, pode-se concluir que os ensaios 6, 13 e 15 foram os que tiveram os maiores consumos de açúcares redutores durante a fermentação, e que alguns ensaios apresentaram respostas estatisticamente diferentes dos demais.

Em resumo, os resultados indicam que alguns ensaios apresentaram maior consumo de açúcares redutores após 12 horas de fermentação, sendo que os ensaios 6, 13 e 15 foram os que apresentaram os maiores valores. No entanto, é importante ressaltar que os resultados devem ser interpretados com cautela, uma vez que outros fatores podem influenciar o consumo de açúcares durante a fermentação.

Tabela 2.11 - Análise de açúcares redutores durante a fermentação dos ensaios realizados do delineamento P&B12.

Ensaio	Tempos de Fermentação											
	0h		8h				12h					
	AR I g AR/ 100mL		AR F* g AR/ 100mL		Consumo AR [I – F*] g AR/ 100mL		AR F** g AR/ 100mL		Consumo AR [I – F**] g AR/ 100mL			
1	28,92	± 0,82	27,18	± 1,64	1,74	± 0,58	B, C, a	24,74	± 2,79	4,18	± 1,39	G, H, I, a
2	19,06	± 0,00	18,83	± 1,64	0,23	± 1,16	C, a	16,16	± 3,77	2,90	± 2,67	H, I, a
3	55,89	± 2,94	52,43	± 0,92	3,47	± 1,25	B, C, a	49,65	± 2,94	6,24	± 0,00	E, F, G, H, I, a
4	82,60	± 4,90	76,88	± 1,72	5,72	± 3,05	A, B, C, a	70,46	± 3,43	12,14	± 1,04	B, C, D, E, F, a
5	43,58	± 2,70	41,44	± 2,89	2,14	± 1,18	B, C, a	31,97	± 0,49	11,62	± 1,56	B, C, D, E, F, a
6	113,81	± 0,98	108,61	± 1,96	5,20	± 1,84	A, B, C, b	91,61	± 2,94	22,20	± 1,39	A, a
7	86,76	± 1,47	81,56	± 7,85	5,20	± 4,51	A, B, C, a	79,82	± 2,45	6,94	± 0,69	D, E, F, G, H, I, a
8	74,10	± 2,70	62,14	± 4,41	11,96	± 1,21	A, a	60,58	± 4,17	13,53	± 1,04	B, C, D, a
9	101,67	± 5,85	92,66	± 2,45	9,02	± 1,51	A, B, a	92,48	± 2,21	9,19	± 0,87	D, E, F, G, H, a
10	80,52	± 0,98	78,26	± 2,70	2,25	± 1,21	B, C, a	74,62	± 0,49	5,90	± 0,60	F, G, H, I, a
11	74,80	± 0,25	67,51	± 2,70	7,28	± 1,73	A, B, C, a	64,22	± 0,98	10,58	± 0,79	C, D, E, F, G, a
12	22,89	± 0,82	21,61	± 3,28	1,28	± 1,74	B, C, a	20,92	± 0,33	1,97	± 0,35	I, a
13	67,77	± 8,59	66,46	± 0,20	1,30	± 5,93	B, C, a	49,97	± 3,07	17,80	± 3,91	A, B, b, a
14	67,04	± 0,61	65,16	± 4,92	1,88	± 1,88	B, C, a	54,16	± 3,68	12,88	± 2,17	B, C, D, E, a
15	68,78	± 8,39	67,62	± 1,84	1,16	± 4,63	B, C, a	52,33	± 0,44	16,45	± 5,50	A, B, C, a
16	62,85	± 2,46	61,25	± 1,43	1,59	± 0,72	B, C, a	51,75	± 4,98	11,09	± 3,35	B, C, D, E, F, a

Legenda: AR- Açúcares Redutores; I- Tempo Inicial (0h); F*- Tempo Final (8h); F** - Tempo Final (12h); [I – F]- [Tempo Inicial – Tempo Final]; A, B,...- Letras maiúsculas diferentes nas colunas indicam diferença estatística pelo teste de Tukey (P<0,05); a, b,...- Letras minúsculas diferentes nas linhas indicam diferença estatística pelo teste de Tukey (P<0,05); Letras iguais não diferem entre si significativamente.

Fonte: autoral, 2022.

A Tabela 2.12 que se segue, traz os resultados obtidos para análise de produção de exopolissacarídeos realizada.

A produção de EPS é desejada em algumas bebidas fermentadas, porque esse composto é um polissacarídeo extracelular produzido por algumas bactérias e fungos durante a fermentação, pode agir como um espessante natural, contribuindo para a textura, viscosidade e estabilidade do produto. Além disso, os EPS podem atuar como prebióticos, estimulando o crescimento de bactérias benéficas no trato gastrointestinal; e, imunomodulatórias, promovendo benefícios à saúde, como a redução de níveis de colesterol, a melhora da imunidade e da saúde intestinal (CARVALHO et al, 2015; KHAN; NIGAM; SINGH, 2017).

De acordo com a tabela, a produção de EPS variou entre 0,16 g/L a 1,99 g/L, em 8h de fermentação, nas diferentes condições de fermentação testadas. O teste de Tukey indicou que não houve diferença estatisticamente significativa na produção de EPS entre os ensaios, ou seja, todas as respostas foram iguais. Em relação aos ensaios com maiores produções de EPS, os ensaios 13, 14, 15 e 16 tiveram produções em torno de 1,5 g/L, enquanto os demais ensaios tiveram produções abaixo de 1 g/L.

Para 12h de fermentação, o teste de Tukey indica que os ensaios 1, 4, 6 e 12 apresentaram produções de EPS estatisticamente diferentes dos demais ensaios ($P < 0,05$). Os ensaios 1, 4 e 12 apresentaram as menores produções de EPS, enquanto o ensaio 6 apresentou a maior produção. Os demais ensaios não apresentaram diferença estatisticamente significativa entre si ($P > 0,05$).

As produções de EPS nos ensaios com mistura de probióticos (PC) foram maiores do que as produções nos ensaios com *Lactobacillus rhamnosus* e *Saccaromyces boulardii* isolados. Os maiores valores de produção de EPS foram observados nos ensaios 13, 14, 15 e 16, com mistura de probióticos (PC), indicando que a presença de ambos os probióticos na fermentação pode ter um efeito sinérgico na produção de EPS.

A presença de ambos os probióticos na fermentação pode ter um efeito sinérgico na produção de EPS devido à interação positiva entre eles. Cada tipo de probiótico possui suas próprias características metabólicas e, quando utilizados em conjunto, podem complementar as funções um do outro, resultando em uma produção maior de EPS (DOS SANTOS; PAVÓN; TAMINE, 2016; WANG et al, 2021).

A *Lactobacillus rhamnosus* é uma bactéria ácido-lática que é capaz de produzir EPS a partir de carboidratos. A *Saccaromyces boulardii* é uma levedura que, além de produzir EPS, também é capaz de fermentar outros compostos, como fibras e polissacarídeos. Dessa forma, a

presença de ambas as espécies pode resultar em uma maior produção de EPS devido à capacidade de cada uma de produzir e utilizar diferentes substratos (KITAZAWA; VILENA, 2020; SOARES et al., 2020).

Além disso, a presença de ambos os probióticos pode ajudar a manter um ambiente microbiano equilibrado durante a fermentação, favorecendo o crescimento de ambas as espécies e, conseqüentemente, a produção de EPS (DE VUYST; LEROY, 2011; LANGA et al., 2019).

A produção de EPS está associada ao crescimento dos microrganismos utilizados na fermentação, já que esse composto é produzido como uma forma de reserva de energia e de proteção celular. No entanto, é importante ressaltar que outros fatores, como a composição do meio de fermentação, a temperatura e o pH, também podem influenciar o crescimento e a produção de EPS (RUAS-MADIEDO et al., 2008; YOON; CHANG, 2017).

Por fim, é importante ressaltar que a produção de EPS é um importante indicador de qualidade para bebidas fermentadas, pois esses compostos podem conferir características funcionais ao produto. A presença de EPS pode também indicar a presença de fibras na bebida, o que pode conferir benefícios à saúde do consumidor, como melhoria do trânsito intestinal e controle do colesterol. Portanto, a produção de EPS é um fator importante a ser considerado na formulação de bebidas probióticas e simbióticas (LEITE et al., 2015; LINARES et al., 2016).

Desta maneira, é possível dizer que as bebidas formuladas sejam simbióticas, já que contém dois probióticos diferentes (*Lactobacillus rhamnosus* e *Saccharomyces boulardii*) e ocorreu a produção de EPS. Porém, não é possível afirmar que a bebida seja rica ou é fonte de fibras apenas com base na produção de EPS, embora o EPS possa conter resíduos de carboidratos complexos, como celulose e hemicelulose, a produção de EPS não é necessariamente associada à produção de fibras, pois a bebida pode conter outros componentes que também contribuem para a presença de fibras. Além disso, é necessário analisar a quantidade de fibras em relação ao tamanho da porção consumida.

Tabela 2.12 - Análise de exopolissacarídeos durante a fermentação dos ensaios realizados do delineamento P&B12.

Ensaio	Tempos de Fermentação																
	0h			8h						12h							
	EPS I g/L			EPS F* g/L			Produção de EPS [F* - I] g/L			EPS F** g/L			Produção de EPS [F** - I] g/L				
1	2,28	±	0,98	2,44	±	0,59	0,17	±	0,42	A, a	2,79	±	0,44	0,51	±	0,55	B, a
2	1,73	±	0,20	1,94	±	0,15	0,20	±	0,15	A, a	2,45	±	1,15	0,72	±	0,95	A, B, a
3	5,53	±	0,55	5,93	±	1,07	0,40	±	0,97	A, a	6,40	±	0,82	0,87	±	0,67	A, B, a
4	2,78	±	0,10	2,98	±	0,25	0,20	±	0,20	A, a	3,21	±	0,17	0,43	±	0,17	B, a
5	5,43	±	0,45	5,60	±	0,56	0,18	±	0,11	A, a	6,41	±	0,93	0,99	±	0,48	A, B, a
6	6,73	±	0,26	7,64	±	0,66	0,90	±	0,88	A, a	8,23	±	1,22	1,49	±	1,00	A, B, a
7	2,72	±	0,97	3,54	±	0,85	0,83	±	0,62	A, a	3,77	±	0,61	1,05	±	0,37	A, B, a
8	8,72	±	1,23	8,95	±	0,42	0,22	±	0,87	A, a	10,04	±	0,62	1,32	±	0,97	A, B, a
9	6,19	±	0,46	6,80	±	1,59	0,61	±	1,13	A, a	7,11	±	0,92	0,92	±	0,51	A, B, a
10	5,73	±	0,42	6,33	±	0,52	0,59	±	0,93	A, a	6,47	±	0,69	0,73	±	0,50	A, B, a
11	3,67	±	0,53	4,21	±	1,05	0,54	±	0,82	A, a	4,35	±	1,00	0,67	±	0,75	A, B, a
12	3,01	±	0,31	3,17	±	0,27	0,16	±	0,52	A, a	3,43	±	0,23	0,42	±	0,51	B, a
13	3,80	±	1,06	5,12	±	1,23	1,32	±	0,50	A, a	6,01	±	0,27	2,20	±	0,50	A, B, a
14	3,93	±	0,10	5,56	±	0,62	1,64	±	0,64	A, a	6,43	±	0,37	2,50	±	0,38	A, a
15	3,99	±	0,26	5,58	±	0,56	1,59	±	0,69	A, a	5,99	±	0,38	2,00	±	0,63	A, B, a
16	3,82	±	0,35	5,81	±	0,25	1,99	±	0,44	A, a	5,98	±	0,70	2,16	±	0,36	A, B, a

Legenda: EPS- Exopolissacarídeos; I- Tempo Inicial (0h); F*- Tempo Final (8h); F**- Tempo Final (12h); [F - I]- [Tempo Final - Tempo Inicial]; A, B,...- Letras maiúsculas diferentes nas colunas indicam diferença estatística pelo teste de Tukey (P<0,05); a, b,...- Letras minúsculas diferentes nas linhas indicam diferença estatística pelo teste de Tukey (P<0,05); Letras iguais não diferem entre si significativamente.

Fonte: autoral, 2022.

Ao observar os resultados na tabela 2.13, podemos perceber que houve uma diminuição significativa do pH em todos os ensaios, indicando que a fermentação ocorreu de forma efetiva.

Analisando a tabela, percebemos que os ensaios 2 (LR), 5 (LR), 6 (LR), 8 (SB) e 12 (SB) tiveram as maiores diminuições de pH durante a fermentação, em comparação com os outros ensaios.

O ensaio 2 (LR) teve um pH inicial de 3,83 e um pH de 3,48 após 12 horas de fermentação, resultando em uma diminuição de 0,35 unidades de pH. O ensaio 5 (LR) teve um pH inicial de 5,19 e um pH de 4,46 após 12 horas de fermentação, resultando em uma diminuição de 0,73 unidades de pH. O ensaio 6 (LR) teve um pH inicial de 3,78 e um pH de 3,36 após 12 horas de fermentação, resultando em uma diminuição de 0,42 unidades de pH. O ensaio 8 (SB) teve um pH inicial de 5,14 e um pH de 4,90 após 12 horas de fermentação, resultando em uma diminuição de 0,24 unidades de pH. Finalmente, o ensaio 12 (SB) teve um pH inicial de 3,81 e um pH de 3,52 após 12 horas de fermentação, resultando em uma diminuição de 0,29 unidades de pH.

No geral, é possível afirmar que todas as amostras apresentaram uma diminuição do pH ao longo da fermentação, indicando que houve um aumento da acidez e, conseqüentemente, um processo de fermentação eficiente.

Tabela 2.13 - Análise de pH durante a fermentação dos ensaios realizados do delineamento P&B12.

Ensaio	Tempos de Fermentação								
	0h			8h			12h		
	pH			pH			pH		
1	5,27	±	0,03	5,26	±	0,03	5,24	±	0,02
2	3,83	±	0,02	3,53	±	0,26	3,48	±	0,27
3	3,73	±	0,02	3,71	±	0,03	3,65	±	0,01
4	3,84	±	0,03	3,62	±	0,02	3,59	±	0,03
5	5,19	±	0,03	4,89	±	0,06	4,46	±	0,07
6	3,78	±	0,04	3,47	±	0,09	3,36	±	0,13
7	5,16	±	0,04	5,01	±	0,09	4,86	±	0,17
8	5,14	±	0,05	4,96	±	0,07	4,90	±	0,05
9	3,89	±	0,04	3,82	±	0,07	3,72	±	0,05
10	5,12	±	0,03	5,00	±	0,04	4,98	±	0,02
11	5,36	±	0,01	5,30	±	0,01	5,26	±	0,02
12	3,81	±	0,04	3,57	±	0,06	3,52	±	0,03
13	4,50	±	0,01	4,34	±	0,02	4,32	±	0,01
14	4,54	±	0,02	4,35	±	0,01	4,33	±	0,01
15	4,45	±	0,03	4,29	±	0,03	4,27	±	0,03
16	4,58	±	0,03	4,39	±	0,03	4,37	±	0,03

Legenda: pH- Potencial hidrogeniônico

Fonte: autoral, 2021

No estudo de Reis et al. (2017), os pesquisadores avaliaram a fermentação do camu-camu com as bactérias probióticas *Lactobacillus plantarum* e *Lactobacillus rhamnosus*. Durante o processo de fermentação, foi observado um aumento na acidez e uma queda no pH do meio, onde a fermentação do camu-camu com as bactérias probióticas resultou em uma diminuição significativa do pH, de 4,42 para 3,67, uma diminuição de 0,75 do pH. Além disso, houve um aumento na acidez total, de 0,15 para 0,34g de ácido láctico/100g de polpa.

A partir da Tabela 2.14, nota-se que a ATT entre os diferentes ensaios obteve resultados divergentes, e que os resultados no tempo 12h foram superiores ao tempo 8h.

Os resultados, para 8h de fermentação, mostram que a acidez titulável total variou de 0,00 a 0,23 mEq/100mL, sendo o valor médio de 0,12 mEq/100mL. Analisando a tabela, observa-se que os ensaios 3 (SB) e 14 (PC) apresentaram os maiores aumentos de acidez titulável total, com valores de 0,23 e 0,17 mEq/100mL, respectivamente. Esses resultados são estatisticamente iguais e foram superiores aos demais ensaios. Além disso, os ensaios 2 (LR), 4 (LR), 5 (LR), 8 (SB) e 9 (SB) também apresentaram aumento significativo de acidez titulável total em relação aos demais ensaios, com valores de 0,13 a 0,17 mEq/100mL.

Após 12h de fermentação, pela tabela, nota-se que as amostras 2, 3, 5, 9 e 13 apresentaram os maiores aumentos na acidez, sendo que as amostras 2 e 5 tiveram um aumento significativamente maior do que as demais. As amostras 1, 6, 10, 11, 12, 14, 15 e 16 não apresentaram diferença estatística em relação às demais amostras.

As amostras 2 (LR), 5 (LR) e 9 (SB) apresentaram as maiores médias de acidez titulável total, com valores de $0,40 \pm 0,10$, $0,47 \pm 0,15$ e $0,50 \pm 0,17$ mEq/100mL, respectivamente. As amostras 1 (LR) e 6 (LR) apresentaram as menores médias de acidez titulável total, com valores de $0,10 \pm 0,10$ e $0,13 \pm 0,21$ mEq/100mL, respectivamente.

Em relação aos ensaios com 8 horas de fermentação, é possível observar que os valores de acidez titulável total obtidos após 12 horas de fermentação foram maiores em todas as amostras, indicando um aumento no grau de acidez da bebida com o tempo de fermentação.

Os resultados mostram que tanto o *L. rhamnosus* quanto o *S. boulardii* apresentaram aumento significativo de acidez titulável total durante a fermentação da bebida à base de polpa de cupuaçu. Além disso, a mistura dos probióticos em partes iguais (PC) também apresentou aumento significativo de acidez. No entanto, não houve diferença significativa na acidez titulável total entre os diferentes probióticos utilizados.

Em resumo, os resultados indicam que é possível obter um aumento significativo de ATT durante a fermentação com probióticos da bebida à base de polpa de cupuaçu. O uso de diferentes probióticos não influenciou significativamente na acidez da bebida.

Tabela 2.14 - Análise da Acidez Titulável Total durante a fermentação dos ensaios realizados do delineamento P&B12.

Ensaio	Tempos de Fermentação												
	0h			8h			12h						
	ATT I mEq/100g		ATT F* mEq/100mL		Variação ATT [F* - I] mEq/100mL			ATT F** mEq/100mL		Variação ATT [F** - I] mEq/100mL			
1	5,60	± 0,00	5,63	± 0,12	0,03	± 0,12	A, a	5,70	± 0,10	0,10	± 0,10	A, a	
2	3,20	± 0,20	3,33	± 0,12	0,13	± 0,31	A, a	3,60	± 0,17	0,40	± 0,10	A, a	
3	5,27	± 0,31	5,50	± 0,26	0,23	± 0,15	A, a	5,60	± 0,20	0,33	± 0,12	A, a	
4	5,47	± 0,12	5,60	± 0,10	0,13	± 0,21	A, a	5,77	± 0,06	0,30	± 0,17	A, a	
5	0,27	± 0,06	0,43	± 0,06	0,17	± 0,06	A, b	0,73	± 0,12	0,47	± 0,15	A, a	
6	5,40	± 0,20	5,50	± 0,10	0,10	± 0,30	A, a	5,53	± 0,06	0,13	± 0,21	A, a	
7	1,80	± 0,00	1,87	± 0,06	0,07	± 0,06	A, a	2,07	± 0,31	0,27	± 0,31	A, a	
8	5,57	± 0,15	5,73	± 0,15	0,17	± 0,15	A, a	5,80	± 0,00	0,23	± 0,15	A, a	
9	3,27	± 0,12	3,40	± 0,10	0,13	± 0,21	A, a	3,77	± 0,06	0,50	± 0,17	A, a	
10	3,37	± 0,06	3,37	± 0,06	0,00	± 0,10	A, a	3,57	± 0,06	0,20	± 0,10	A, a	
11	0,67	± 0,12	0,67	± 0,06	0,00	± 0,10	A, a	0,83	± 0,06	0,17	± 0,15	A, a	
12	3,07	± 0,06	3,13	± 0,06	0,07	± 0,06	A, a	3,30	± 0,10	0,23	± 0,06	A, a	
13	4,27	± 0,06	4,40	± 0,20	0,13	± 0,15	A, a	4,55	± 0,05	0,28	± 0,10	A, a	
14	4,37	± 0,15	4,53	± 0,12	0,17	± 0,25	A, a	4,57	± 0,06	0,20	± 0,20	A, a	
15	4,33	± 0,12	4,47	± 0,12	0,13	± 0,12	A, a	4,53	± 0,12	0,20	± 0,20	A, a	
16	4,40	± 0,20	4,50	± 0,10	0,10	± 0,26	A, a	4,63	± 0,06	0,23	± 0,15	A, a	

Legenda: ATT- Acidez Titulável Total; I- Tempo Inicial (0h); F*- Tempo Final (8h); F** - Tempo Final (12h); [F - I]- [Tempo Final - Tempo Inicial]; A, B,...- Letras maiúsculas diferentes nas colunas indicam diferença estatística pelo teste de Tukey (P<0,05); a, b,...- Letras minúsculas diferentes nas linhas indicam diferença estatística pelo teste de Tukey (P<0,05); Letras iguais não diferem entre si significativamente.

Fonte: autoral, 2022.

3.3.1 Ácidos orgânicos

Os probióticos podem secretar substâncias como ácidos orgânicos e bacteriocinas que podem ter efeitos bactericidas ou bacteriostáticos contra bactérias patogênicas. O ácido láctico é o principal produto do metabolismo das BAL e atua na desnaturação de proteínas, alterando a permeabilidade da membrana externa das bactérias (ORNELLAS et al., 2017).

Na indústria de alimentos, as bactérias do ácido láctico (BAL), bactérias não ácido lácticas e leveduras tem um papel importante nos processos de fermentação ao produzirem alguns ácidos orgânicos ou ácidos graxos de cadeia curta (AGCC), incluindo ácido acético, butírico e propiônico, já que estes atuam como conservantes naturais, acidulantes e intensificadores de sabor e possuem efeito probiótico, por isso são denominados como pós-bióticos (THERON; LUES, 2010; AGUILAR-TOALÁ, et al, 2018). O ácido láctico não está naturalmente presente nos alimentos, mas é produzido durante a fermentação dos alimentos pelas bactérias do ácido láctico, e é o principal produto final da fermentação de um carboidrato (THERON; LUES, 2010).

A produção de ácido láctico é desejada, em contraposição ao ácido acético em bebidas fermentadas, que ocasiona sabor desagradável. Mondragón-Bernal (2004) verificou que durante a fermentação do extrato de soja, *B. longum* tanto puro quanto em mistura com lactobacilos apresentou maior produção de ácido láctico (L) que de ácido acético (A), sendo a relação $L/A > 1$ e desejável para aceitação sensorial de bebidas probióticas contendo bifidobactérias.

O ácido cítrico, encontrado como constituinte natural de uma variedade de frutas cítricas, e presente na polpa de cupuaçu, pode ser utilizado como substrato pelas bactérias lácticas para a produção de ácido láctico e outros compostos aromáticos como diacetil e acetaldeído, compostos aromáticos que contribuem para a qualidade sensorial de alimentos fermentados, uma vez que uma característica metabólica de certas BAL é a capacidade de metabolizar o ácido cítrico (PEREIRA et al., 2017; HUGENHOLTZ, 1993).

Soluções padrão de conhecidas concentrações de ácidos propiônico, tartárico, cítrico, málico, acético e láctico foram usados para realizar a análise de determinação de ácidos orgânicos, no entanto, foi somente detectado leituras no HPLC dos ácidos cítrico, láctico e acético, porcentagens de produção e consumo desses ácidos e relação do ácido láctico com ácido acético estão demonstrados na Tabela 2.15 e Figuras 2.4 e 2.5 a seguir.

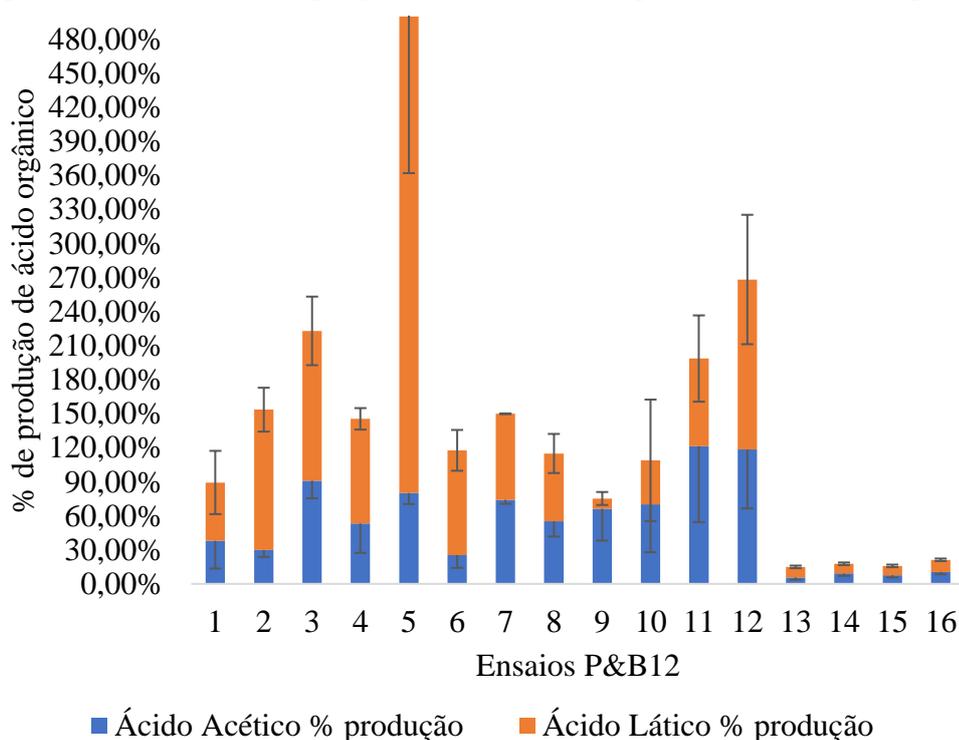
Tabela 2.15 - % de produção e consumo de ácidos orgânicos após 8h de fermentação das bebidas probióticas a base de cupuaçu e relação de ácido láctico e ácido acético dos ensaios definidos pelo delineamento experimental Plackett&Burman.

Ensaio	Produção de Ácido Acético		Produção de Ácido Láctico		Consumo de Ácido Cítrico		Relação L/A
1	37,96%	± 0,25	51,38%	± 0,28	-19,65%	± 0,03	1,91
2	29,78%	± 0,06	123,75%	± 0,19	-18,42%	± 0,13	3,47
3	90,91%	± 0,15	132,06%	± 0,30	-42,46%	± 0,07	1,90
4	53,17%	± 0,26	92,28%	± 0,09	-31,28%	± 0,16	1,82
5	80,06%	± 0,10	419,88%	± 1,38	-17,21%	± 0,05	17,90
6	25,33%	± 0,11	92,35%	± 0,18	-6,78%	± 0,03	7,37
7	74,13%	± 0,04	75,75%	± 0,00	-49,13%	± 0,10	1,15
8	55,17%	± 0,13	59,74%	± 0,17	-22,98%	± 0,06	1,10
9	66,21%	± 0,28	9,02%	± 0,06	-23,53%	± 0,04	0,14
10	69,98%	± 0,42	38,89%	± 0,54	-22,04%	± 0,03	0,88
11	121,29%	± 0,67	77,32%	± 0,38	-49,82%	± 0,11	0,89
12	118,41%	± 0,52	149,86%	± 0,57	-16,32%	± 0,08	1,77
13	5,71%	± 0,02	9,26%	± 0,01	-7,22%	± 0,02	1,92
14	9,21%	± 0,02	8,50%	± 0,01	-6,20%	± 0,02	1,14
15	7,70%	± 0,02	8,14%	± 0,01	-7,54%	± 0,02	1,30
16	10,49%	± 0,02	10,70%	± 0,01	-10,14%	± 0,02	1,29

Legenda: % de Produção - Aumento de ácido acético e ácido láctico após 8h de fermentação em relação ao tempo inicial (0h); % de Consumo - Diminuição do ácido cítrico após 8h de fermentação em relação ao tempo inicial (0h); ácido láctico (L); ácido acético (A).

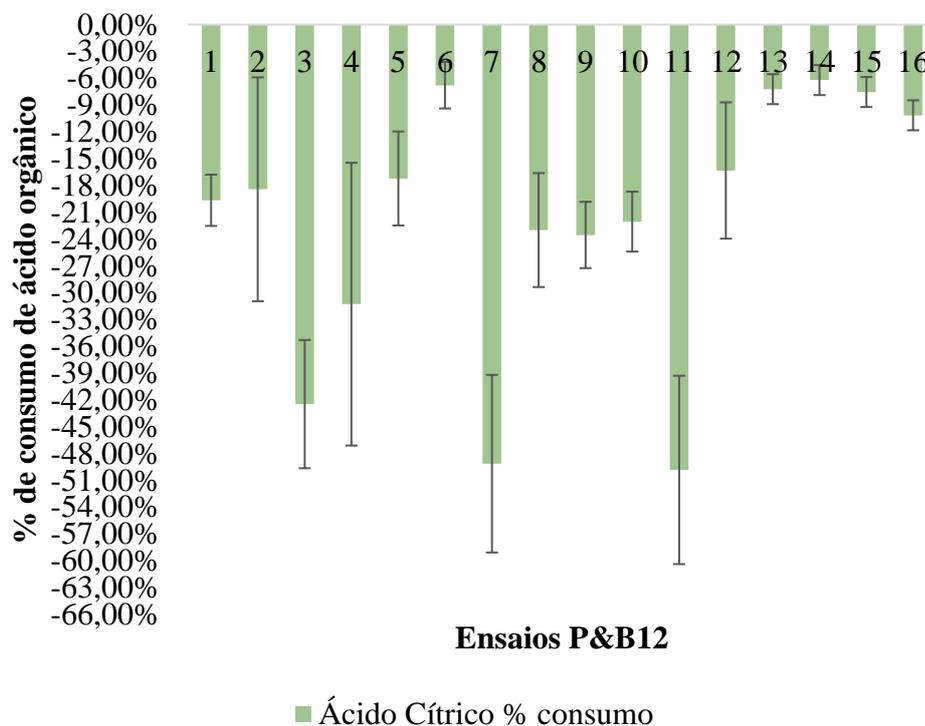
Fonte: autoral, 2023.

Figura 2.4 - % de produção de ácido acético e ácido láctico após 8h de fermentação das bebidas probióticas a base de cupuaçu, ensaios definidos pelo delineamento experimental.



Fonte: autoral, 2023.

Figura 2.5 - % de consumo de ácido cítrico após 8h de fermentação das bebidas probióticas a base de cupuaçu, ensaios definidos pelo delineamento experimental Plackett&Burman.



Fonte: autoral, 2023.

Bactérias do ácido láctico (BAL), utilizam o ácido cítrico e os açúcares da polpa para formar o ácido láctico, um composto não volátil (RAMOS et al., 2020). *S. boulardii* utiliza ácidos orgânicos e glicose disponíveis para consumo, estimulando o crescimento (FARINAZZO, 2016). O ensaio 05 apresentou maior porcentagem de produção de ácido láctico (419,88%), seguido pelos ensaios 2 (123,75%), 3 (132,06%), 6 (92,35%) e 12 (149,86%). Observou-se que a diminuição no teor de açúcares se relacionou diretamente com a produção dos ácidos orgânicos láctico e acético.

Neste estudo verifica-se qualitativamente que a produção de ácido láctico é maior que a de ácido acético, com exceção dos ensaios 09 (0,14), 10 (0,88) e 11 (0,89), ao longo de 08 horas de fermentação, dando uma taxa de $LA < 1$. O ensaio 09, apresentou uma baixa produção de ácido láctico, e a menor relação de ácido láctico e ácido acético.

Nas fermentações com a mistura *L. rhamnosus* e *S. boulardii*, os pontos centrais do estudo (ensaios 13 a 16), a produção tanto de ácido láctico, quanto de ácido acético foi menor em comparação aos demais ensaios.

Os ácidos orgânicos produzidos por lactobacilos são conhecidos por afetar o metabolismo de *Saccharomyces* se forem inoculados juntos. No entanto, os ácidos orgânicos

nem sempre são produzidos apenas pelos lactobacilos porque a levedura também gera os mesmos ácidos como produtos menores do metabolismo (MOUSA, WANG e ZHANG, 2019).

Em recente pesquisa, Mousa, Wang e Zhang (2019) avaliaram o efeito da fermentação por *Saccharomyces boulardii* e diversos lactobacilos no conteúdo de ácido láctico e acético em bebida láctea contendo suco de kiwi (4% v/v), fermentada por 12h a 37 °C. Os autores verificaram que a fermentação concomitante por *S. boulardii* e lactobacilos acarretou uma diminuição no teor de ácido láctico e acético, possivelmente em função da diminuição na velocidade do metabolismo dos lactobacilos testados ou pelo consumo destes ácidos orgânicos pela levedura, comportamento semelhante ao observado neste estudo.

Os ácidos láctico e acético são produzidos principalmente por microrganismos através da quebra da lactose do leite. No leite fortificado com suco de kiwi ou sem esse suco, a inoculação com *S. boulardii* e lactobacilos aumentou a produção de ácido rapidamente e em maior grau, em relação ao uso isolado de *S. boulardii*. No entanto, a produção de ácido declinou logo após 6 h de fermentação. Isso era de se esperar, uma vez que a competição do *S. boulardii* causou um estresse no metabolismo dos lactobacilos (MOUSA, WANG e ZHANG, 2019).

As concentrações iniciais de ácido cítrico neste estudo foram caindo no decorrer da fermentação, reduzindo em até -49,82% de sua concentração. Pereira et al. (2017), também relataram redução do ácido cítrico em bebida de cupuaçu durante a fermentação. Segundo os autores, *Lactobacillus casei* conseguiu metabolizar o ácido cítrico como fonte de carbono, indicando que este suco é um substrato adequado para a produção de bebidas probióticas.

3.3.2 Plackett & Burman 12 - efeitos das variáveis independentes

A matriz e as respostas do delineamento experimental Plackett&Burman de 12 ensaios e 4 pontos centrais aplicados para determinar o efeito de sete variáveis independentes para formulação e seleção de microrganismos para desenvolvimento de bebida probiótica à base de cupuaçu (*Theobroma grandiflorum*), em relação a contagens, AR, AT, EPS e Ácido Láctico e Ácido Acético das bebidas fermentadas apresentam-se na Tabela 2.16.

Tabela 2.16 - Plackett & Burman para formulação e seleção de microrganismos para desenvolvimento de bebida probiótica à base de cupuaçu.

Ensaio	Variáveis independentes							Respostas														
								8h de fermentação						12h de fermentação								
	LR:SB	Temp (°C)	Teor Polpa (%)	Teor EHAC (%)	Teor Farinha Arroz (%)	Teor Sac. (%)	pH	CCT	EPS	AT	AR	pH	ATT	Ác. Lat.	Ác. Acé.	Ác. Cít.	CCT	EPS	AT	AR	pH	ATT
1.	1	-1	1	-1	-1	-1	1	0,97	0,17	5,84	1,74	0,01	0,03	0,016	0,009	-0,262	1,89	0,51	7,24	4,18	0,03	0,10
2.	1	1	-1	1	-1	-1	-1	2,69	0,20	0,23	0,23	0,30	0,13	0,033	0,001	-0,035	2,00	0,72	0,47	2,90	0,35	0,40
3.	-1	1	1	-1	1	-1	-1	1,95	0,40	1,30	3,47	0,02	0,23	0,035	0,019	-0,112	1,96	0,87	1,42	6,24	0,07	0,33
4.	1	-1	1	1	-1	1	-1	1,22	0,20	2,33	5,72	0,23	0,13	0,006	0,005	-0,084	1,19	0,43	5,83	12,14	0,25	0,30
5.	1	1	-1	1	1	-1	1	1,70	0,18	8,03	2,14	0,30	0,17	0,201	0,011	-0,016	2,12	0,99	30,18	11,62	0,74	0,47
6.	1	1	1	-1	1	1	-1	1,71	0,90	6,22	5,20	0,32	0,10	0,036	0,005	-0,013	1,68	1,49	13,73	22,20	0,42	0,13
7.	-1	1	1	1	-1	1	1	2,81	0,83	13,34	5,20	0,16	0,07	0,014	0,012	-0,143	2,56	1,05	17,23	6,94	0,30	0,27
8.	-1	-1	1	1	1	-1	1	1,63	0,22	3,63	11,96	0,18	0,17	0,006	0,006	-0,163	1,72	1,32	8,16	13,53	0,24	0,23
9.	-1	-1	-1	1	1	1	-1	1,89	0,61	12,44	9,02	0,07	0,13	0,002	0,015	-0,041	2,08	0,92	16,32	9,19	0,17	0,50
10.	1	-1	-1	-1	1	1	1	1,23	0,59	1,55	2,25	0,12	0,00	0,010	0,008	-0,232	1,00	0,73	8,81	5,90	0,14	0,20
11.	-1	1	-1	-1	-1	1	1	1,51	0,54	2,59	7,28	0,06	0,00	0,025	0,020	-0,124	1,59	0,67	5,31	10,58	0,10	0,17
12.	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	1,22	0,16	2,35	1,28	0,24	0,07	0,033	0,019	-0,052	0,99	0,42	5,83	1,97	0,29	0,23
13.	0	0	0	0	0	0	0	0,95	1,32	6,94	1,30	0,16	0,13	0,001	0,002	-0,061	0,92	2,20	28,72	17,80	0,19	0,28
14.	0	0	0	0	0	0	0	0,93	1,64	6,61	1,88	0,19	0,17	0,004	0,004	-0,010	0,86	2,50	26,34	12,88	0,20	0,20
15.	0	0	0	0	0	0	0	0,96	1,59	7,69	1,16	0,16	0,13	0,005	0,002	-0,011	0,87	2,00	25,90	16,45	0,18	0,20
16.	0	0	0	0	0	0	0	0,92	1,99	7,91	1,59	0,19	0,10	0,003	0,002	-0,026	0,86	2,16	23,41	11,09	0,21	0,23

Legenda: LR- *Lactobacillus rhamnosus*; SB- *Saccharomyces boulardii*; Temp- Temperatura; EHAC- Extrato Hidrossolúvel da Amêndoa do Cupuaçu; Sac.- Sacarose; CCT- Crescimento celular total; EPS- Exopolissacarídeos; AT- Açúcares Totais; AR- Açúcares Redutores; ATT- Acidez Total Titulável; Ác. Lát- Ácido Láctico; Ác. Acé- Ácido Acético; Ác. Cít- Ácido Cítrico

Fonte: autoral, 2022.

A Tabela 2.17 a seguir apresenta os resumos dos efeitos principais das variáveis independentes e coeficiente de variação explicada (R^2) e as variáveis que apresentaram significância ($p < 0,1$) para cada uma das seis respostas do delineamento experimental Plackett&Burman.

Tabela 2.17 - Resumo dos efeitos das variáveis independentes e coeficiente de variação explicada para as respostas do delineamento experimental Plackett & Burman 12.

Variáveis Independentes	Efeitos Estimados nas Respostas					
	Y ₁ – CCT	Y ₂ – AR	Y ₃ – AT	Y ₄ – EPS	Y ₅ – Ácido Lático	Y ₆ – Ácido Acético
Após 8h de fermentação						
R²	0,8308	0,78291	0,44987	0,93413	0,68917	0,82787
Média	1,71	4,63	4,99	0,42	0,035	0,011
x₁ – Proporção LR:SB	-0,25	-3,47	-1,91	-0,09	0,03	-0,01
x₂ – (°C) Temperatura	0,70	-1,41	0,59	0,18	0,05	0,001
x₃ – (%) Polpa	0,01	1,85	0,91	0,08	-0,03	-0,003
x₄ – (%) EHAC	0,56	2,18	3,36	-0,09	0,02	-0,005
x₅ – (%) Farinha de Arroz	-0,05	2,10	1,08	0,14	0,03	-0,0004
x₆ – (%) Sacarose	0,03	2,31	2,85	0,39	-0,04	0,0003
x₇ – pH	-0,14	0,94	1,69	0,009	0,02	0,0006
Após 12h de fermentação						
R²	0,81364	0,63856	0,74927	0,93626	-	-
Média	1,73	8,95	10,04	0,84	-	-
x₁ – Proporção LR:SB	-0,17	1,75	1,997	-0,06	-	-
x₂ – (°C) Temperatura	0,51	2,26	2,69	0,24	-	-
x₃ – (%) Polpa	0,20	3,84	-2,22	0,21	-	-
x₄ – (%) EHAC	0,42	0,88	5,98	0,12	-	-
x₅ – (%) Farinha de Arroz	0,06	5,00	6,12	0,42	-	-
x₆ – (%) Sacarose	-0,98	4,42	2,32	0,08	-	-
x₇ – pH	0,16	-0,32	5,56	0,07	-	-

* Em negrito apresentam-se as variáveis com efeito significativo ($p < 0,1$) sobre as respostas para estabilidade, calculados através do SS residual, com curvatura. CCT- Crescimento celular total; AR- Açúcares Redutores; AT- Açúcares Totais; EPS- Exopolissacarídeos.

Fonte: autoral, 2022.

Através do cálculo dos efeitos principais e o erro padrão ($p < 0,1$) para o produto terminado logo após a fermentação, para a Y₁ – Crescimento celular total (CCT), tanto em 8h, quanto para 12h, apenas as variáveis independentes x₂ – (°C) Temperatura e x₄ – (%) EHAC, apresentam efeitos sobre o crescimento celular, sendo este efeito positivo, ou seja, que quanto maior a temperatura e maior a quantidade de EHAC, maior será o crescimento. Para a produção de Exopolissacarídeos (Y₄), em 8h de fermentação a x₆ – (%) Sacarose apresentou efeito positivo, e após as 12h de fermentação foi o efeito x₅ – (%) Farinha de Arroz.

Em relação à produção de ácidos orgânicos, observa-se que para a produção de acetato, a levedura *S. boulardii* teve a melhor contribuição, e para a produção de ácido lático foi a *L. rhamnosus*. Para a temperatura, apesar de não ser significativa na produção de ácido acético, em ambos ácidos o efeito foi positivo. O EHAC teve efeito negativo sobre a produção de ácido acético, o que significa que menores teores de EHAC poderia melhorar a aceitação da bebida.

No estudo utilizando o suco de cupuaçu, o tempo de 8 h de fermentação foi suficiente para a linhagem *L. casei* atingir sua viabilidade máxima, com valores superiores a 9,0 Log UFC/mL (PEREIRA et al., 2017).

Em uma pesquisa analisando as condições de fermentação em uma bebida probiótica de cupuaçu, também foi observada a viabilidade da inoculação do microrganismo *L. casei* na bebida. Inoculou-se 7,00 Log UFC/mL e após 24 h de fermentação microbiana, contagens superiores a 8,00 Log UFC/mL foram observados (PEREIRA et al., 2017).

Nota-se que somente a proporção LR:SB exerceu influência significativa sobre o consumo dos açúcares redutores, sendo que esta influência é negativa. Dessa forma entende-se que na presença de LR (nível +1 é 100% LR e 0% SB- Tabelas 2.1 e 2.2), menor será a concentração de açúcares redutores na amostra, ou seja, o maior consumo de AR se dá pelo lactobacilo.

Observa-se que no tempo de fermentação de 12 horas, nenhuma das variáveis exerceu influência negativa ou positiva sobre os açúcares redutores da amostra.

Nota-se que as variáveis verificadas não exerceram influência negativa ou positiva sobre os açúcares redutores totais da amostra quando o tempo de fermentação utilizado foi o de 8 horas.

Nota-se que, no tempo de fermentação de 8 horas, o teor de sacarose influencia positivamente a produção de EPS nas amostras analisadas, quando maior o teor de sacarose, maior será a produção de EPS.

Evidencia-se que o teor de farinha de arroz tem efeito positivo na produção de EPS na amostra quando fermentada após 12 horas, ou seja, quanto maior o teor da farinha de arroz, maior será a produção de EPS.

Nota-se que, no tempo de fermentação de 8 horas na produção do ácido lático apenas a temperatura influenciou significativamente com efeito, positivo, e para a produção do ácido acético foi a relação LR:SB e o Teor do Extrato Hidrossolúvel da Amêndoa do Cupuaçu (EHAC), ambos com efeito negativo.

3.3.3 Cor instrumental

A cor é o primeiro atributo de qualidade dos alimentos avaliado pelos consumidores, portanto, é um importante componente da qualidade dos alimentos relevante para a aceitação no mercado. A medição rápida e objetiva da cor dos alimentos é necessária no controle de qualidade para a classificação comercial dos produtos. A visão computacional é uma técnica promissora atualmente investigada para medição de cor de alimentos, especialmente com a capacidade de fornecer uma caracterização detalhada da uniformidade de cor ao nível baseado em píxel (WU e SUN, 2013). Na Tabela 2.18 podem ser observados os valores da análise de cor dos meios fermentativos elaborados segundo o P&B12, no tempo inicial (0h) e tempos finais (8h e 12h) de fermentação.

L^* , a^* e b^* foi usado para caracterizar as mudanças de cor. A análise estatística dos valores de a^* e b^* indicou que não houve diferença significativa ($p < 0,05$) entre as bebidas vegetais ao longo do tempo de fermentação, indicando que não houve alteração de cor das bebidas.

A luminosidade, L^* , sendo um parâmetro colorimétrico amplamente utilizado para caracterizar a variação de cores durante o processamento de alimentos, determinou que uma pequena diferença de luminosidade (valores de L^*) foi observada nos ensaios 5 e 10.

A luminosidade aumentou no ensaio 8 e 9 ao longo do período de fermentação, resultando em produtos com coloração mais clara e mais turvas, enquanto para os ensaios 4 e 7, L^* diminuiu após 8h de fermentação, e aumento após 12h. O aumento de L^* pode estar associado ao consumo do substrato do meio para aumento da biomassa dos microrganismos. Não houve diferença significativa ($p < 0,05$) para luminosidade (L^*) para os ensaios 1, 2, 3, 6, 11, 12, 13, 14, 15 e 16 no período de fermentação.

Tabela 2.18 - Coordenadas de cor.

Ensaio	L*			a*			b*		
	0h	8h	12h	0h	8h	12h	0h	8h	12h
1	11,81 ± 0,11 ^a	11,40 ± 0,53 ^a	11,69 ± 0,21 ^a	-0,52 ± 0,14 ^a	-0,53 ± 0,26 ^a	-0,52 ± 0,12 ^a	-1,31 ± 0,25 ^a	-1,17 ± 0,22 ^a	-1,25 ± 0,51 ^a
2	9,215 ± 1,43 ^a	8,38 ± 0,86 ^a	8,59 ± 1,55 ^a	-0,46 ± 0,30 ^a	-0,27 ± 0,18 ^a	-0,27 ± 0,20 ^a	-0,86 ± 0,19 ^a	-0,96 ± 0,37 ^a	-0,94 ± 0,33 ^a
3	13,89 ± 2,05 ^a	12,57 ± 0,81 ^a	11,56 ± 0,52 ^a	-0,36 ± 0,16 ^a	-0,20 ± 0,10 ^a	-0,30 ± 0,13 ^a	-0,52 ± 0,21 ^a	-0,77 ± 0,27 ^a	-0,73 ± 0,30 ^a
4	14,62 ± 1,50 ^a	8,71 ± 1,14 ^b	17,00 ± 0,09 ^a	-0,47 ± 0,34 ^a	-0,32 ± 0,08 ^a	-0,59 ± 0,20 ^a	-0,94 ± 0,61 ^a	-0,56 ± 0,16 ^a	-0,69 ± 0,69 ^a
5	14,86 ± 2,16 ^a	12,13 ± 1,09 ^{ab}	10,11 ± 0,11 ^b	-0,36 ± 0,21 ^a	-0,41 ± 0,09 ^a	-0,26 ± 0,08 ^a	-0,77 ± 0,71 ^a	-1,21 ± 0,06 ^a	-0,73 ± 0,01 ^a
6	15,44 ± 1,20 ^a	15,30 ± 2,09 ^a	15,16 ± 3,19 ^a	-0,58 ± 0,24 ^a	-0,66 ± 0,14 ^a	-0,74 ± 0,06 ^a	-0,55 ± 0,50 ^a	-0,65 ± 0,44 ^a	-0,75 ± 0,39 ^a
7	11,79 ± 1,96 ^b	10,16 ± 1,37 ^b	16,68 ± 1,78 ^a	-0,49 ± 0,22 ^a	-0,36 ± 0,04 ^a	-0,75 ± 0,17 ^a	-1,02 ± 0,22 ^a	-1,10 ± 0,39 ^a	-0,74 ± 0,37 ^a
8	9,96 ± 0,94 ^b	13,83 ± 1,78 ^a	13,64 ± 0,29 ^a	-0,38 ± 0,20 ^a	-0,51 ± 0,13 ^a	-0,33 ± 0,14 ^a	-0,77 ± 0,35 ^a	-0,76 ± 0,42 ^a	-0,75 ± 0,18 ^a
9	12,05 ± 1,48 ^b	12,13 ± 0,96 ^b	23,64 ± 2,97 ^a	-0,75 ± 0,35 ^a	-0,54 ± 0,14 ^a	-0,77 ± 0,39 ^a	-0,34 ± 0,88 ^a	-1,01 ± 0,28 ^a	-0,07 ± 0,75 ^a
10	10,37 ± 0,36 ^b	11,20 ± 0,52 ^{ab}	11,82 ± 0,31 ^a	-0,51 ± 0,16 ^a	-0,38 ± 0,06 ^a	-0,47 ± 0,12 ^a	-0,96 ± 0,24 ^a	-1,03 ± 0,07 ^a	-1,08 ± 0,03 ^a
11	10,91 ± 2,85 ^a	14,41 ± 0,71 ^a	13,79 ± 1,17 ^a	-0,39 ± 0,14 ^a	-0,32 ± 0,16 ^a	-0,39 ± 0,09 ^a	-1,11 ± 0,20 ^a	-0,81 ± 0,46 ^a	-1,27 ± 0,24 ^a
12	11,43 ± 1,78 ^a	9,79 ± 0,59 ^a	10,94 ± 0,43 ^a	-0,31 ± 0,10 ^a	-0,37 ± 0,16 ^a	-0,46 ± 0,13 ^a	-0,83 ± 0,09 ^a	-0,68 ± 0,20 ^a	-0,87 ± 0,26 ^a
13	14,84 ± 1,46 ^a	15,03 ± 1,52 ^a	16,35 ± 0,01 ^a	-0,42 ± 0,01 ^a	-0,33 ± 0,07 ^a	-0,58 ± 0,04 ^a	-0,88 ± 0,05 ^a	-0,68 ± 0,08 ^a	-0,75 ± 0,05 ^a
14	14,13 ± 2,27 ^a	15,81 ± 7,05 ^a	16,24 ± 2,40 ^a	-0,48 ± 0,10 ^a	-0,33 ± 0,09 ^a	-0,53 ± 0,09 ^a	-0,87 ± 0,03 ^a	-0,69 ± 0,18 ^a	-0,70 ± 0,19 ^a
15	14,11 ± 2,23 ^a	14,44 ± 1,15 ^a	15,48 ± 1,42 ^a	-0,42 ± 0,05 ^a	-0,29 ± 0,04 ^a	-0,53 ± 0,10 ^a	-0,88 ± 0,04 ^a	-0,69 ± 0,17 ^a	-0,73 ± 0,05 ^a
16	14,87 ± 1,50 ^a	15,79 ± 0,76 ^a	16,35 ± 0,01 ^a	-0,47 ± 0,08 ^a	-0,39 ± 0,04 ^a	-0,57 ± 0,03 ^a	-0,86 ± 0,03 ^a	-0,67 ± 0,08 ^a	-0,72 ± 0,19 ^a

Legenda: L*- luminosidade (L = 0 preto e L = 100 branco); a* e b*- cromaticidade (+a vermelho e -a verde; +b amarelo e -b azul). a, b,...- Letras minúsculas diferentes nas linhas indicam diferença estatística pelo teste de Tukey (P<0,05)

Fonte: autoral, 2023.

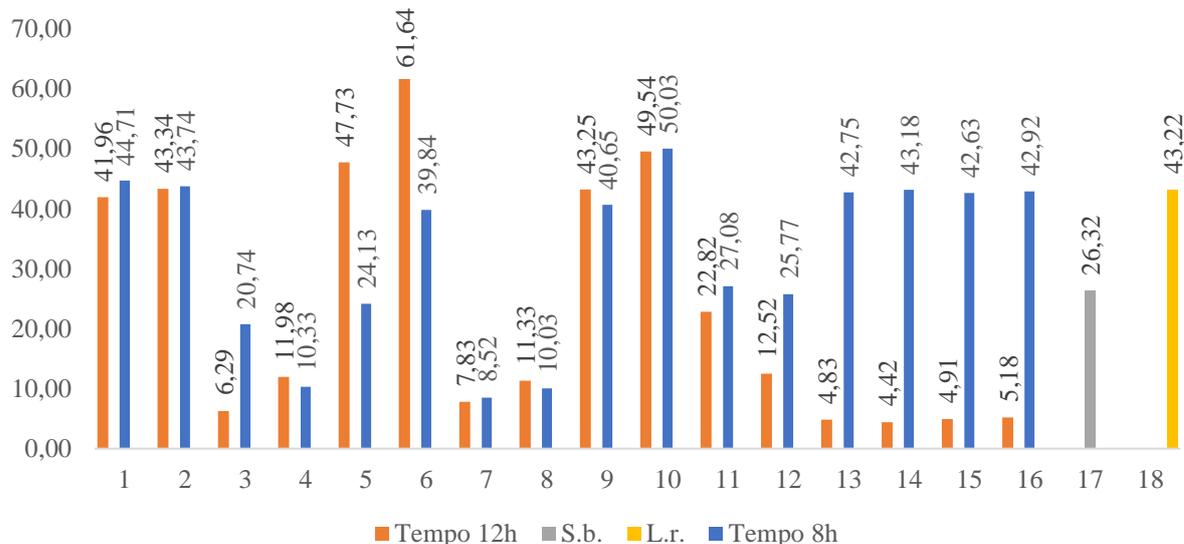
3.3.4 Teste de funcionalidade

3.3.4.1 Hidrofobicidade

A adesão à mucosa intestinal é considerada um pré-requisito para a colonização e é importante para a interação entre cepas probióticas e o hospedeiro, a porcentagem de hidrofobicidade é uma medida indireta da capacidade de aderência dos lactobacilos, bifidobacterias, leveduras ou outros microrganismos ao GALT (Tecido Linfoide Associado ao Intestino) (BERMUDEZ-BRITO et al., 2012).

Sendo assim, na Figura 2.6, encontra-se representada a porcentagem hidrofobicidade (%H) obtida para os microrganismos puros e bebidas fermentadas elaboradas pelo P&B12 nos tempos 8h e 12h de fermentação.

Figura 2.6 - Porcentagem de Hidrofobicidade (%H) das linhagens puras de L.r. (*Lactobacillus rhamnosus*), S.b. (*Saccharomyces boulardii*) e tempos finais (8h e 12h) de fermentação das bebidas elaboradas a base de cupuaçu.



Fonte: autoral, 2023.

Lactobacillus rhamnosus foi o microrganismo que apresentou maior porcentagem de hidrofobicidade (%H) (43,22%). Da mesma forma é observado nos ensaios inoculados com esta BAL (ensaios 1, 2, 5, 6 e 10), onde a hidrofobicidade variou 24,13~50,03%H, em 8h de fermentação, e para 12h, variou de 41,96~61,64%H.

Ensaio fermentados com a levedura *Saccharomyces boulardii*, tiveram as menores hidrofobicidades, sendo ensaio 4 (8h = 8,52%H; 12h = 7,83%H) e ensaio 7 (8h = 10,03%H;

12h = 11,33% H). Os ensaios 3 (8h = 20,74% H), 11 (8h = 27,08% H; 12h = 22,82% H) e 12 (8h = 25,77% H), apresentaram a mesma faixa de hidrofobicidade da cepa pura (26,32% H).

Segundo o protocolo descrito por Nader-Macías et al. (2008), a hidrofobicidade pode ser classificada como: alta (66,67%), média (33,34-66,66%) e baixa (0-33,35%). Sendo assim, a maioria dos ensaios e a cepa L.R. apresentaram hidrofobicidade média.

No entanto, Lima (2018) encontrou cepas de *Lactobacillus* com moderadas e altas hidrofobicidades, sendo que *L. rhamnosus* Lb16 ($94,19 \pm 1,73\%$), *L. rhamnosus* Lb24 ($78,06 \pm 2,72\%$) e *L. rhamnosus* Lb2 ($54,66 \pm 4,36\%$), apresentaram valores superiores encontrados para *L. rhamnosus* LR32 utilizado neste estudo. O valor para de SB apresentaram valores semelhantes aos relatados por Oliveira (2018), apresentando H% de 24,91%, e acima dos resultados encontrados por Ceugniz et al. (2017), quem concluiu que todas as cepas testadas pelos autores mostraram afinidade ao hexadecano abaixo de 10%.

3.3.4.2 Resistência de probióticos às condições simuladas do aparelho digestório humano

Após as análises realizadas no P&B12, repetiram-se os ensaios com maiores CCT, estes sendo os ensaios 2 ($2,690 \text{ Log UFC.mL}^{-1}$), 3 ($1,950 \text{ Log UFC.mL}^{-1}$), 7 ($2,812 \text{ Log UFC.mL}^{-1}$) e 9 ($1,886 \text{ Log UFC.mL}^{-1}$), além de dois ensaios do ponto central (Tabela 2.9). Agora padronizou-se a concentração inicial do inóculo em $7,49\sim 8,67 \text{ Log UFC.mL}^{-1}$, nota-se que em comparação aos ensaios do P&B12, que iniciaram a concentração inicial com uma população menor do inóculo, esta repetição obteve uma menor taxa de crescimento, variando entre $1,00\sim 1,63 \text{ Log UFC.mL}^{-1}$ (Tabela 2.19).

Paim et al. (2015), demonstrou o mesmo comportamento estudando culturas probióticas com diferentes concentrações iniciais (0,001, 0,01 e 0,1% m/v) em uma bebida fermentada de soja, onde *L. acidophilus* apresentou CCT de 0,95, 0,29 e 0,17 Log UFC.mL^{-1} , respectivamente, e para *B. animalis* subsp. *Lactis* CCT variou de 1,51, 0,37 e $-0,07 \text{ Log UFC.mL}^{-1}$, respectivamente.

Ao submeter os resultados obtidos das CCT nos tempos de fermentação de 8h e 12h em teste de Tukey, constatou-se que não se obteve diferença estatística com nível de confiança de 95%, conforme demonstra nas Tabela 2.19, desta maneira, a análise de resistência de probióticos às condições simuladas do aparelho digestório humano procedeu-se somente para as fermentações no tempo de 8h.

Os alimentos carregam componentes bioativos, entre eles os probióticos, que podem sofrer mudanças pelo efeito do pH ou atividade de enzimas gastrointestinais. Nesse contexto, a

avaliação preliminar *in vitro* do produto probiótico frente às condições gastrointestinais simuladas torna-se obrigatória (FAO/WHO, 2002). Testar a eficácia da ação probiótica de alimentos recém-desenvolvidos depende da disponibilidade de modelos de digestão, que simulam com precisão os eventos físico-químico e fisiológico que ocorrem no aparelho digestório humano.

De forma geral pode se observar que houve uma redução da população dos microrganismos após realização dos testes de resistência ao aparelho digestório *in vitro*, até chegar a valores próximos a $2 \text{ Log}_{10} \text{ UFC.mL}^{-1}$ na fase intestinal, no entanto, é possível determinar que depois do processo fermentação do cupuaçu (Tabela 2.19), a simulação *in vitro* do aparelho digestório humano foi eficiente para a obtenção de cepas probióticas dos diferentes microrganismos (Tabela 2.20).

Na literatura são apresentados resultados com relação à sobrevivência do *L. acidophilus*. Bianchi et al. (2018) avaliaram a sobrevivência de *L. paracasei* L-431, *L. acidophilus* LA-5 e *B. longum* BB-46, combinadas ou não com subproduto de acerola, às condições do trato gastrointestinal simuladas *in vitro*. Os autores observaram que o *L. acidophilus* LA-5 teve menor sobrevivência em todas as fases estudadas (gástrica, entérica I e entérica II).

Dados similares foram encontrados por Leite (2021) onde em diferentes períodos de armazenamento da cepa probiótica *B. animalis* subsp. *lactis* Bb-12 apresentou sobrevivência semelhante nas fases gástrica e entérica I, assim caracterizou-a como uma excelente cepa com tolerância ao ácido gástrico e à bile. De acordo com isto pode se determinar que as cepas utilizadas possuem uma boa tolerância à simulação gástrica.

Aspectos da funcionalidade pós-probiótica devem ser melhorados, já que houve em média 31% de sobrevivência após a fase intestinal, perdendo até 4 ciclos log e ficando com contagens inferiores a 3 logUFC/mL , resultado não sendo considerado suficiente, o recomendado é que a contagem celular seja mantida em números elevados para colonizar o intestino grosso, principalmente, sendo que no mínimo 6 logUFC/mL , o que significaria 80-90% de sobrevivência (VINDEROLA; MOCCHIUTTI; REINHEIMER, 2000) FAO/WHO, 2002).

Tabela 2.19 - Contagem dos microrganismos e crescimento celular durante a fermentação dos ensaios com maiores taxas de crescimento celular realizados do delineamento P&B12.

Ensaio	Tempos de Fermentação																			
	0h			8h						12h										
	CI			CF*			CCT = [CF* - CI]			CF**			CCT = [CF** - CI]							
	Log UFC.mL ⁻¹			Log UFC.mL ⁻¹			Log UFC.mL ⁻¹			Log UFC.mL ⁻¹			Log UFC.mL ⁻¹							
2	7,49	±	0,06	A, b	9,01	±	0,43	C, a	1,52	±	0,46	A, a	8,90	±	0,42	B, a	1,41	±	0,45	A, a
3	8,67	±	0,10	A, b	10,28	±	0,18	A, a	1,61	±	1,38	A, a	9,90	±	0,35	A, B, a	1,23	±	1,03	A, a
7	8,43	±	0,21	A, b	10,06	±	0,44	A, B, a	1,63	±	0,42	A, a	9,73	±	0,68	A, B, a	1,29	±	0,49	A, a
9	8,38	±	0,30	A, b	9,48	±	0,25	B, C, a	1,10	±	0,32	A, a	9,94	±	0,08	A, a	1,56	±	0,23	A, a
13	7,76	±	0,16	A, b	8,89	±	0,10	C, a	1,13	±	0,09	A, a	8,96	±	0,04	A, B, a	1,20	±	0,15	A, a
14	7,91	±	0,21	A, b	8,91	±	0,04	C, a	1,00	±	0,04	A, a	8,92	±	0,05	A, B, a	1,01	±	0,00	A, a

Legenda: UFC- Unidade Formadora de Colônias; CCT- Crescimento Celular Total; CI- Contagem Inicial; CF*- Contagem Final (8h); CF**- Contagem Final (12h); A, B,...- Letras maiúsculas diferentes nas colunas indicam diferença estatística pelo teste de Tukey (P<0,05); a, b,...- Letras minúsculas diferentes nas linhas indicam diferença estatística pelo teste de Tukey (P<0,05); Letras iguais não diferem entre si significativamente.

Fonte: autoral, 2023.

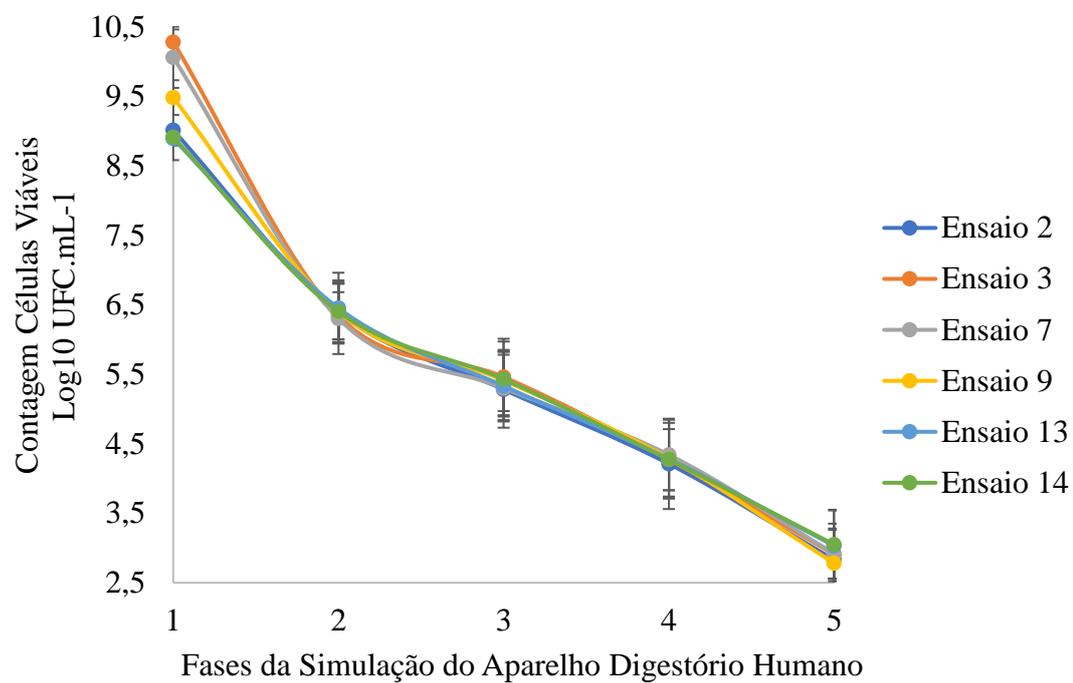
Tabela 2.20 - Contagem total dos microrganismos após realização dos testes de resistência ao aparelho digestório in vitro.

Ensaio	Fermentação 8h		(2) Fase Oral			(3) Fase Gástrica 1h			(4) Fase Gástrica 2h			(5) Fase Intestinal							
	(1) Fase Inicial		Contagem Células Viáveis		%	Contagem Células Viáveis		%	Contagem Células Viáveis		%	Contagem Células Viáveis		%					
	Log ₁₀ UFC.mL ⁻¹		Log ₁₀ UFC.mL ⁻¹		Sobrevivência	Log ₁₀ UFC.mL ⁻¹		Sobrevivência	Log ₁₀ UFC.mL ⁻¹		Sobrevivência	Log ₁₀ UFC.mL ⁻¹		Sobrevivência					
2	9,01	± 0,43	C, a	6,39	± 0,43	A, b	71	5,28	± 0,55	A, b, c	59	4,21	± 0,65	A, c, d	47	2,83	± 0,52	A, d	31
3	10,28	± 0,18	A, a	6,34	± 0,34	A, b	62	5,46	± 0,55	A, b, c	53	4,27	± 0,44	A, c, d	42	2,91	± 0,35	A, d	28
7	10,06	± 0,44	A, B, a	6,30	± 0,51	A, b	63	5,30	± 0,48	A, b, c	53	4,34	± 0,51	A, c, d	43	2,92	± 0,36	A, d	29
9	9,48	± 0,25	B, C, a	6,40	± 0,45	A, b	68	5,41	± 0,44	A, b, c	57	4,29	± 0,56	A, c, d	45	2,78	± 0,31	A, d	29
13	8,89	± 0,10	C, a	6,45	± 0,51	A, b	73	5,33	± 0,49	A, b, c	60	4,28	± 0,57	A, c, d	48	3,03	± 0,51	A, d	34
14	8,91	± 0,04	C, a	6,40	± 0,40	A, b	72	5,43	± 0,54	A, b, c	61	4,27	± 0,53	A, c, d	48	3,05	± 0,50	A, d	34

Legenda: UFC- Unidade Formadora de Colônias. A, B,...- Letras maiúsculas diferentes nas colunas indicam diferença estatística pelo teste de Tukey (P<0,05); a, b,...- Letras minúsculas diferentes nas linhas indicam diferença estatística pelo teste de Tukey (P<0,05); Letras iguais não diferem entre si significativamente.

Fonte: autoral, 2023.

Figura 2.7 - Declínio da viabilidade celular após passagem dos ensaios em condições simuladas do aparelho digestório humano



Legenda: UFC- Unidade Formadora de Colônias; Fase Inicial (1); Fase Oral (2); Fase Gástrica 1h (3); Fase Gástrica 2h (4); Fase Intestinal (5).

Fonte: autoral, 2023.

4. CONSIDERAÇÕES FINAIS

O meio fermentativo contendo polpa e extrato hidrossolúvel da amêndoa do cupuaçu foi considerado bom para o cultivo da BAL *L. rhamnosus* e da levedura *S. boulardii*, já que uma diversidade de nutrientes presentes nesses meios contribui para o crescimento celular. Mesmo em condições acidez mais alta, os microrganismos conseguiram se desenvolver em todos os ensaios e produzir quantidade suficiente de células para que as bebidas fermentadas os possam ser considerados probióticos, em destaque citamos o ensaio 7 com apenas SB (37°C; 20% EHAC), no qual apresentou o maior CCT com aumento de 2,81 ciclos Log UFC.mL⁻¹ em 8h de fermentação, no entanto, concentração final de células não diferiu estatisticamente nos diferentes tempos de fermentação, sugerindo que 8 horas de fermentação já são suficientes para o crescimento dos microrganismos.

Ao observar os efeitos que tiveram significância sobre os meios fermentativos foram a temperatura e EHAC, com efeito positivo, sobre o crescimento celular total; em relação ao consumo de açúcares redutores, o meio fermentativo com *S. boulardii* apresentou melhor desempenho; para a produção de EPS destacamos a adição de sacarose e a farinha de arroz (este adicionado com o intuito de melhorar a quantidade de proteína ao meio); o efeito positivo em relação a temperatura também atuou na melhor performance de produção de ácido lático; além disso os meios com menores quantidade de EHAC apresentaram as maiores concentrações de ácido acético, mostrando que a utilização desse extrato beneficia na diminuição na produção deste ácido que pode ocasionar sabores indesejáveis.

Aspectos da funcionalidade pós-probiótica devem ser melhorados, já que houve em média 31% de sobrevivência após a fase intestinal não é considerado suficiente, o recomendado é que a contagem celular seja mantida em números elevados para colonizar o intestino grosso principalmente, sendo que no mínimo 6 logUFC/mL, o que significaria 80-90% de sobrevivência. No entanto, possível capacidade de aderência ao GALT foi evidenciada, pois foi atingindo um nível médio de hidrofobicidade de 61,64%.

Com base nos resultados obtidos na pesquisa e na literatura disponível, sugerimos a realização de estudos futuros para melhorar a resistência de probióticos às condições do trato digestório humano. Para isso, pode ser considerada a encapsulação do *Lactobacillus rhamnosus* e da *Saccharomyces boulardii*, a fim de protegê-los e garantir sua sobrevivência durante a passagem pelo sistema digestório. Além disso, sugerimos a continuidade do estudo, utilizando técnicas como o Delineamento do Composto Central Rotacional (DCCR), para aprimorar os

resultados obtidos e obter informações mais precisas sobre a sobrevivência e o comportamento desses probióticos em diferentes condições.

REFERÊNCIAS

- ADEBIYI, J. A. et al. Comparison of nutritional quality and sensory acceptability of biscuits obtained from native, fermented, and malted pearl millet (*Pennisetum glaucum*) flour. **Food chemistry**, v. 232, p. 210-217, 2017. DOI: 10.1016/j.foodchem.2017.04.020.
- AGUILAR-TOALÁ, J. E. et al. Postbiotics: An evolving term within the functional foods field. **Trends in Food Science and Technology**, v. 75, p. 105–114, 2018.
- AOAC, 2012. Official Methods of Analysis of AOAC INTERNATIONAL. J. Assoc. Off. Agric. Chemists 19th. Ed, 1–95, 2012.
- ARAÚJO, A. A. S. et al. Determinação dos teores de umidade e cinzas de amostras comerciais de guaraná utilizando métodos convencionais e análise térmica. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 42, p. 269-277, 2006.
- BARBOSA, P. P. M.; GALLINA, D. A. Viabilidade de bactérias (starter e probióticas) em bebidas elaboradas com iogurte e polpa de manga. **Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes**, v. 72, n. 2, p. 85-95, 2017.
- BASTOS, G. A.; PAULO, E. M.; CHIARADIA, A. C. N. Estabilidade de micro-organismos potencialmente probióticos em barra de cereais - efeito da técnica de incorporação. **Revista de Ciências Farmaceuticas Basica e Aplicada**, v. 36, n. 2, p. 311–317, 2015.
- BERMUDEZ-BRITO, M., et al. Probiotic Mechanisms of Action. **Ann Nutr Metab.** 61:160–174. 2012.
- BIANCHI, F. et al. Impact of combining acerola by-product with a probiotic strain on a gut microbiome model. **International Journal of Food Sciences and Nutrition**, v. 70, n. 2, p. 182–194, 2019.
- BICHO, N. C. et al. Use of colour parameters for roasted coffee assessment. **Food Science and Technology**, Campinas, v. 32, n. 3, p. 436-442, jul./set. 2012.
- BRASIL. Ministério da Agricultura e do Abastecimento. **Instrução Normativa n. 37, de 1º de outubro de 2018. Regulamento técnico geral de parâmetros analíticos de suco e de polpa de frutas e a listagem das frutas e demais quesitos complementares aos padrões de identidade e qualidade.** Diário Oficial da República Federativa do Brasil, Brasília - DF, 2018.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. **Manual integrado de vigilância epidemiológica do botulismo**– Brasília: Editora do Ministério da Saúde, 88 p.: il. ISBN 85-334-1030-1. 2006.
- CANUTO, G. A. B. et al. Caracterização físico-química de polpas de frutos da amazônia e sua correlação com a atividade anti-radical livre. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 32, n. 4, p. 1196–1205, 2010.
- CARVALHO, F. C., et al. Exopolysaccharides produced by lactic acid bacteria: Technological and human health applications. **Food and Nutrition Sciences**, 6(4), 364-374. 2015.

CAVALCANTI, A. L. et al. Determinação dos sólidos solúveis totais (OBRIX) e pH em bebidas lácteas e sucos de frutas industrializados. **Pesquisa Brasileira em Odontopediatria e Clínica Integrada**, v. 6, n. 1, p. 57-64, 2006.

CELIBERTO, L. S. **Efeito de uma bebida probiótica (Enterococcus faecium CRL 183 e Bifidobacterium longum ATCC 15707) à base de extrato aquoso de soja no desenvolvimento de colite quimicamente induzida em ratos**. Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual Paulista. “Júlio de Mesquita Filho”. Faculdade de Ciências Farmacêuticas. Programa de Pós Graduação em Alimentos e Nutrição. 2014.

CETESB, 2022. Companhia Ambiental do Estado de São Paulo. **FIT - ficha de informação toxicológica: Xileno**. Divisão de Toxicologia Humana e Saúde Ambiental. Disponível em: <https://cetesb.sp.gov.br/laboratorios/wp-content/uploads/sites/24/2021/05/Xileno.pdf>. Acesso em: 14 de fev. 2023.

CEUGNIEZ, A., et al. Anti-Salmonella activity and probiotic trends of Kluyveromyces marxianus S-2-05 and Kluyveromyces lactis S-3-05 isolated from a French cheese, Tomme d'Orchies. **Research in Microbiology**. Volume 168, Issue 6, July–August, Pages 575-582. 2017.

CHERUBIN, R. A. **Efeitos da viabilidade da levedura e da contaminação bacteriana na fermentação alcoólica**. Tese (Doutorado em Agronomia, Área Concentração Microbiologia Agrícola). Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”. Universidade de São Paulo. São Paulo. Brasil. 2003.

CHIM, J. F.; ZAMBAZI, R. C.; RODRIGUES, R. S. Estabilidade da vitamina c em néctar de acerola sob diferentes condições de armazenamento. **Revista Brasileira de Produtos Agroindustriais**, v. 15, p. 321-327, 2013.

CHITARRA, M. I. F.; CHITARRA, A. B. Pós-colheita de frutos e hortaliças: fisiologia e manuseio. 2. ed. Lavras: UFLA, 2005.

COMMISSION INTERNACIONALE DE L'ECLAIRAGE (CIE). **Colorimetry**. 2. ed. Viena: Central Bureau of the CIE, 1986. 78 p.

DA SILVA, A. J. M. et al. Recursos naturais amazônicos como fontes potenciais de probióticos: uma revisão. **Research, Society and Development**, v. 11, n. 4, p. e48611427496-e48611427496, 2022.

DE PAULA, B. P. et al. Technological features of Saccharomyces cerevisiae var. boulardii for potential probiotic wheat beer development. **LWT - Food Science and Technology** 135 (2021) 110233.

DE VUYST, L.; LEROY, F. Bacteriocins from lactic acid bacteria: production, purification, and food applications. **Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology**, 20(2), 100-118. 2011.

DIAS, J. D. M. et al. Desenvolvimento e avaliação das características físico-químicas e da aceitação sensorial de doce em massa de cupuaçu. **Boletim do Centro de Pesquisa de Processamento de Alimentos**, v. 36, n. 1, 2019.

DOS SANTOS, K. M.; PAVÓN, Y. V.; TAMIME, A. Y. Use of different combinations of probiotics to produce functional fermented milk. **International Dairy Journal**, 58, 1-10. 2016.

DOS SANTOS, A. S. et al. Tratamento nutricional para gestante com DMG na região Amazônica: revisão bibliográfica. **Research, Society and Development**, v. 10, n. 15, p. e14101522632-e14101522632, 2021.

FAO/WHO, 2002. **Guidelines for the evaluation of probiotics in food**. Report of a Joint FAO/WHO Working Group on Drafting Guidelines for the Evaluation of Probiotics in Food. World Health Organization, London Ontario, Canada.

FARINAZZO, F. S. Maçã orgânica e convencional: estudo cinético da fermentação com *Saccharomyces boulardii* e efeito protetor ao estresse oxidativo celular. Dissertação (Mestrado em Ciência de Alimentos). Universidade Estadual de Londrina. Londrina. 2016.

FREIRE, M. T. A.; et al. Caracterização físico-química, microbiológica e sensorial de polpa de cupuaçu congelada (*Theobroma grandiflorum* Schum). **Brazilian Journal of Food Technology**, v. 12, n. 1, p. 9-16, 2009.

GOH K.T., et al. Evaluation and modification of existing methods for the quantification of exopolysaccharides in milk-based media. **Food Research Internacional**. v.38, p. 605 613, 2005.

GONDIM, T. M. S., et al. **Aspectos da produção de cupuaçu**. Rio Branco: Embrapa Acre, 2001. 43 p. (Embrapa Acre. Documentos, 67).

GUIMARÃES, P. M. R., et al. Role of yeasts in biotechnological processes. **In Yeast Biotechnology: Diversity and Applications** (pp. 1-33). Springer. 2019.

HERNÁNDEZ-TORRES, D. L. **Cinética, formulação e funcionalidade de fermentados de farinha de yacon (*S. sonchifolius*) e amendoim (*Arachis hypogae* L.) por quatro linhagens probióticas**. Dissertação para obtenção do título de mestre em Ciência dos Alimentos: Universidade Federal de Lavras, Minas Gerais, Brasil, 2019.

HOFFMANN, F. L. Fatores limitantes à proliferação de microorganismos em alimentos. **Brasil alimentos**, v. 9, n. 1, p. 23-30, 2001.

HUGENHOLTZ, J. Citrate metabolism in lactic acid bacteria. **FEMS Microbiology Reviews**, Volume 12, Issue 1-3, September 1993, Pages 165–178.

KHAN, M. T.; NIGAM, P. S.; SINGH, D. Fermentation process optimization for enhanced exopolysaccharides (EPS) production by probiotic *Lactobacillus paracasei*. **Biochemical Engineering Journal**, 128, 1-8. 2017.

KIMURA, S. Glycemic carbohydrate and health: background and synopsis of the Symposium. **Nutrition Reviews**, v.61, n.5, p.S1-S4, 2003.

KITAZAWA, H.; VILLENA, J. Modulation of the immune system and the intestinal environment by *Lactobacillus rhamnosus* CGMCC 1.3724 in the context of vaccine adjuvants. **Microorganisms**, 8(4), 496. 2020.

LANGA, S., et al. Role of *Saccharomyces boulardii* in the maintenance of intestinal microbial homeostasis. **Journal of Microbiology and Biotechnology**, 29(12), 1909-1916. 2019.

LEITE, A. M., et al. Probiotic potential of a promising EPS-producing *Streptococcus thermophilus* strain isolated from Brazilian dairy products. **LWT-Food Science and Technology**, 62(2), 1083-1088. 2015.

LEITE, M. S. **Influência da matriz de gelado comestível sobre o comportamento e a sobrevivência de cepas probióticas a condições do trato gastrointestinal simuladas in vitro**. Dissertação para obtenção do Título de Mestre: Universidade de São Paulo, São Paulo, Brasil, 2021.

LEROY, F.; DE VUYST, L. Fermented foods as a dietary source of live organisms. **Frontiers in microbiology**, 5, 698. 2014.

LIMA, M. S. F. **Caracterização microbiológica, bioquímica e funcional do leite de ovelha fermentado por grãos de kefir**. Tese (Doutorado em Biologia Aplicada à Saúde). Universidade Federal de Pernambuco. Recife-PE. 2018.

LIMA, S. S., et al. Enriquecimento de iogurtes com microalgas e frutas tropicais: uma revisão narrativa. **Ciência e Tecnologia de Alimentos: Pesquisa e Práticas Contemporâneas**, v. 1, n. 1, p. 341-354, 2021.

LINARES, D. M., et al. Factors influencing the production of exopolysaccharides from lactic acid bacteria. **International Journal of Food Microbiology**, 220, 71-78. 2016.

MACEDO, R. E. F., et al. Desenvolvimento de embutido fermentado por *Lactobacillus* probióticos: características de qualidade. **Food Science and Technology**, v. 28, p. 509-519, 2008.

MARTIM, S. R.; NETO, J. C.; OLIVEIRA; I. M. de A. Características físico-químicas e atividade da peroxidase e polifenoloxidase em genótipos de cupuaçu (*Theobroma grandiflorum* Willd ex-Spreng Schum) submetidos ao congelamento. **Ciências Agrárias**, v. 34, n. 5, p.2265-2276, 2013.

MENEZES, E. W.; PURGATTO, E. **Determinação de cinzas em alimentos**. Universidade De São Paulo-Faculdade De Ciências Farmacêuticas, Departamento De Alimentos E Nutrição Experimental, 2016.

MILLER, G. L. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. **Analytical Chemistry**, Washington, v. 31, n. 3, p. 426-428, 1959.

MISHRA, V.; PRASAD, D. N. Application of in vitro methods for selection of *Lactobacillus casei* strains as potential probiotics. **Int J Food Microbiol** v. 103 (1): p. 109-115. 2005.

MONDRAGÓN-BERNAL, O. L. **Desenvolvimento de uma bebida fermentada a partir de extrato hidrossolúvel de soja, contendo agentes probióticos e prebióticos**. Dissertação apresentada à Faculdade de Engenharia de Alimentos da Universidade Estadual de Campinas. UNICAMP, para obtenção do título de Mestre em Engenharia de Alimentos. UNICAMP, Campinas, Brasil, 2004.

MONDRAGÓN-BERNAL, O. L.; MAUGERI, F. Review: Bacterias lácticas: Funcionalidad, polisacáridos, potencial terapéutico y aplicaciones en alimentos. **Revista Publicaciones e Investigación**, v. 2, n. 1, p. 69–96, 2008.

MONDRAGÓN-BERNAL, O. L. **Desenvolvimento de alimento simbiótico fermentado de soja**. Tese de doutorado apresentada à Faculdade de Engenharia de Alimentos da Universidade Estadual de Campinas UNICAMP, para obtenção do título de Doutor em Engenharia de Alimentos. UNICAMP, Campinas, Brasil, 2009.

MONDRAGÓN-BERNAL, O. L. et al. Stability and functionality of synbiotic soy food during shelf-life. **Journal of Functional Foods**, v. 35, p. 134–145, 2017.

MOUSA, A. H., WANG, G., ZHANG, H. Production of lactic and acetic acids during fermentation of milk fortified with kiwi juice using *Saccharomyces boulardii* and *Lactobacilli*. **Tropical Journal of Pharmaceutical Research**, 18 (4), 681-687. 2019.

MULET-CABERO, A. I., et al. A standardised semi-dynamic in vitro digestion method suitable for food – an international consensus. **Food Funct.**, 11, 1702–1720. 2020.

NADER-MACÍAS, M. E. F., et al. Advances in the design of probiotic products for the prevention of major diseases in dairy cattle. **J Ind Microbiol Biotechnol**. 35:1387–1395. 2008.

NARDI, R. M. D. Comparação de seis produtos probióticos contendo *Saccharomyces boulardii*. **RBM**, v. 62, n. 94, 2005.

NGOME, M. T. et al. Inoculum concentration and inoculation time for propionic acid production from whey using mixed culture of *Lactobacillus helveticus* and *Propionibacterium freudenreichii* PS-1. **Acta Scientiarum - Technology**, v. 39, p. 543–550, 2017.

OLIVEIRA, D. R. **Avaliação in vitro do potencial probiótico de leveduras e o uso na elaboração de uma bebida fermentada a base de soro de leite e suco de beterraba**. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agrícola). Universidade Federal de Lavras-UFLA. Lavras-MG. 2018.

ORNELLAS, R. M. S. et al. Selection of Lactic Acid Bacteria with Probiotic Potential Isolated from the Fermentation Process of “Cupuaçu” (*Theobroma grandiflorum*). **Advances in Microbiology, Infectious Diseases and Public Health.**, v. 973, p. 1–16, 2017.

PAIM, D. R. S. F. et al. Efeito da concentração de culturas probióticas na fermentação de uma bebida de soja. In: ANAIS DO SIMPÓSIO NACIONAL DE BIOPROCESSOS E SIMPÓSIO DE HIDRÓLISE ENZIMÁTICA DE BIOMASSAS (SHEB). **Anais eletrônicos...** Campinas, Galoá, 2015.

PELAIS, A. C. A. **Cupuassu nectar added soy protein and probiotics and evaluation of their effects in vivo on wistar rats induced to pre neoplastic lesions**. 2014. 118 f. Tese (Doutorado em Ciência de Alimentos; Tecnologia de Alimentos; Engenharia de Alimentos) - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2014.

- PEREIRA, A., et al. Impact of fermentation conditions on the quality and sensory properties of a probiotic cupuassu (*Theobroma grandiflorum*) beverage. **Food Res Int.**100:603–11. 2017.
- POMBO, J. C. P., MEDEIROS, H. H. B. R., PENA, R. D. Optimization of the spray drying process for developing cupuassu powder. **J Food Sci Technol** 57, 4501–4513. 2020.
- RAMOS, S. N. M. et al. Formation of volatile compounds during cupuassu fermentation: Influence of pulp concentration. **Food Research International**. Volume 87, September, Pages 161-167. 2016.
- RAMOS, S. et al. Influence of pulp on the microbial diversity during cupuassu fermentation. **International Journal of Food Microbiology**, v. 318, n. 108465, p. 1–14, 2020.
- RODRIGUES, B. S. **Resíduos da agroindústria como fonte de fibras para elaboração de pães integrais**. 96 f. Dissertação (Mestrado em Ciências em Tecnologia de Alimentos) - Universidade de São Paulo, São Paulo, 2010.
- RODRIGUES, S; SILVA, E. O.; BRITO, E. S. **Exotic Fruits Reference guide**. ©Academic Press 2018. 1ª Edição – 5 jan. 2018. 183p. ISBN: 9780128031384.
- RODRIGUES, M. I.; IEMMA, A. F. **Planejamento de Experimentos e Otimização de Processos**. 3. ed. São Paulo: Cárita, 2014.
- RODRÍGUEZ, A. F. M. **Compuestos funcionales y aprovechamiento agroindustrial de frutas nativas amazónicas. Una revisión documental**. Tese em tecnología e inocuidad de los alimentos. Benemérita Universidad autónoma De Puebla. 2018.
- RUAS-MADIEDO, P., et al. Mucin degradation by Bifidobacterium strains isolated from the human intestinal microbiota. **Applied and Environmental Microbiology**, 74(6), 1936-1940. 2008.
- SANTOS FILHO, A. F.; TORO, M. J. U. Estudo bioquímico da fermentação do cupuaçu (*Theobroma grandiflorum* schum). **Multidisciplinary Journal**– V.8 N.2 – P. 1 – 24. (2020).
- SILVA, R. N., et al. Comparação de métodos para a determinação de açúcares redutores e totais em mel. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**. v.23, n.3, 2003.
- SILVA, L. S. **Avaliação da eficiência de três linhagens de leveduras na produção de bebida alcoólica fermentada de cupuaçu (*Theobroma grandiflorum* Schum)**. 2011. 56 f. Dissertação (Mestrado em Ciências de Alimentos) - Universidade Federal do Amazonas, Manaus, 2011.
- SILVA, L. H. M. et al. Caracterização química da amêndoa de frutos amazônicos e seu aproveitamento na elaboração de extratos. p. 3366-3373. In: **Anais do XX Congresso Brasileiro de Engenharia Química - COBEQ 2014 [= Blucher Chemical Engineering Proceedings, v.1, n.2]**. São Paulo: Blucher, 2015. DOI: [10.5151/CHEMENG-COBEQ2014-0312-26063-155249](https://doi.org/10.5151/CHEMENG-COBEQ2014-0312-26063-155249)

SILVA, J. F., et al. Comparação entre as características bromatológicas das amêndoas de cacau (*Theobroma cacao*), cupuaçu (*Theobroma grandiflorum*) e cupuí (*Theobroma subincanum*). **ENCICLOPÉDIA BIOSFERA, Centro Científico Conhecer** - Goiânia, v.15 n.28; p. 312. 2018.

SILVA, J. F., et al. Composição bromatológica de frutos nativos da região do vale do juruá, Acre. **ENCICLOPÉDIA BIOSFERA, Centro Científico Conhecer** - Goiânia, v.15 n.28; p. 238. 2018.

SOARES, J. C., et al. Fermentation of orange bagasse with *Saccharomyces boulardii*: Evaluation of the chemical composition and production of bioactive compounds. **Food Science and Technology International**, 26(5), 459-468. 2020.

SOUZA, J. M. L., et al. **Caracterização de Amêndoas de Cupuaçu Despeliculadas e Torta Parcialmente Desengordurada**. A Contribuição da ciência para a agropecuária no Acre: anais. Rio Branco, AC: Embrapa Acre, p. 141-146. 2020.

StatSoft, Inc. (2008). **STATISTICA** (data analysis software system), version 8.0. www.statsoft.com.

TACO – Tabela Brasileira de Composição de Alimentos. NEPA-UNICAMP. 4. ed. Revisada e ampliada. 161 p. Campinas, 2011.

Tabela Brasileira de Composição de Alimentos (TBCA). Universidade de São Paulo (USP). Food Research Center (FoRC). Versão 7.2. São Paulo, 2022. [Acesso em: 16 de jan de 2023]. Disponível em: <http://www.fcf.usp.br/tbca>.

TANSSINI, K. K. **CARACTERIZAÇÃO DE FARINHAS DE SEMENTES DE CUPUAÇU E APROVEITAMENTO NA PRODUÇÃO DE BISCOITOS TIPO COOKIES**. Trabalho de Curso (Curso de Farmácia). Universidade Federal de Mato Grosso – UFMT. Sinop-MT, 2016.

TAVARES, T. R. **EFEITO DA PRÉ-GELATINIZAÇÃO DA PROTEÍNA DE ERVILHA NAS PROPRIEDADES FÍSICO-QUÍMICAS DE ENCAPSULADOS DE ÓLEO DE CUPUAÇU (*Theobroma grandiflorum*)**. Dissertação (Mestrado em Agricultura no Trópico Úmido). Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia – INPA. Manaus. 2022.

THERON, M. M.; LUES, J. F. R. **Organic Acids and Food Preservation** (1st ed.). CRC Press. 2010.

VINDEROLA, G.; MOCCHIUTTI, P.; REINHEIMER, J. Interactions among lactic acid starter and probiotic bacteria used for fermented dairy products. **Journal of Dairy Science**, 83(4), 707-716. 2000.

WANG, X.; et al. Optimization of exopolysaccharide production by mixed culture of *Lactobacillus plantarum* and *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis*. **International Journal of Biological Macromolecules**, 180, 92-99. 2021.

WU, D.; SUN, D. W. Colour measurements by computer vision for food quality control – A review, **Trends in Food Science & Technology**, Volume 29, Issue 1, Pages 5-20, ISSN 0924-2244, 2013.

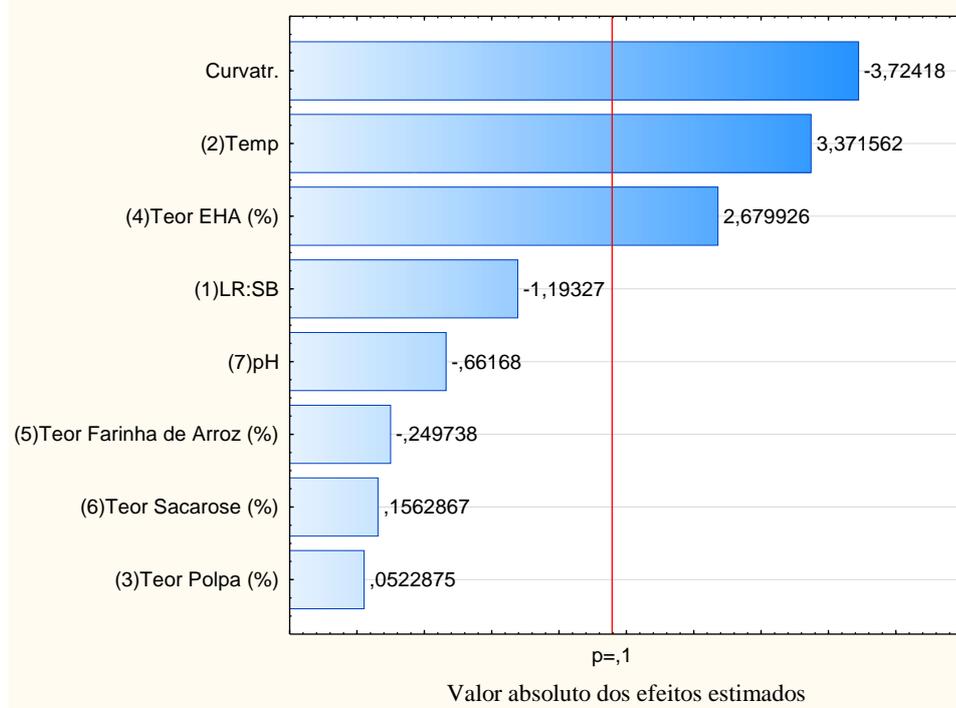
YOON, S. H.; CHANG, H. I. Production of exopolysaccharides by lactic acid bacteria: structural characterization, rheological behavior, and potential application as a fat replacer. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, 57(6), 1280-1293. 2017.

Agradecimento à FAPEMIG e CNPq pelo apoio financeiro ao projeto.

APÊNDICE A

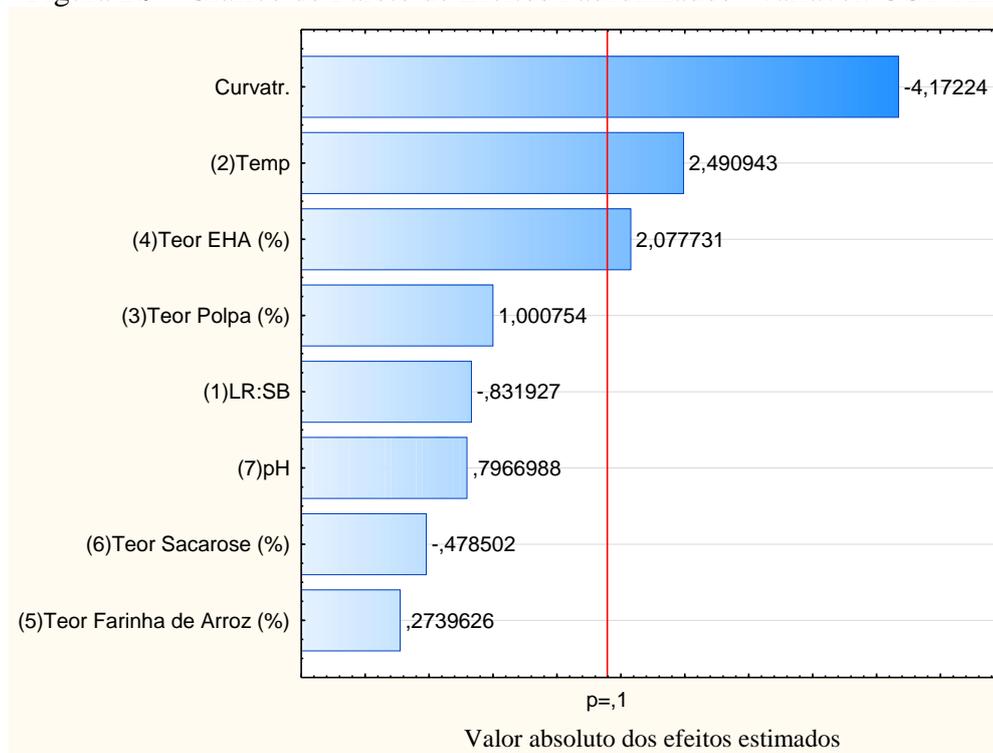
Gráficos de pareto dos efeitos das variáveis independentes

Figura 2.8 - Gráfico de Pareto de Efeitos Padronizados - variável: CCT 8h



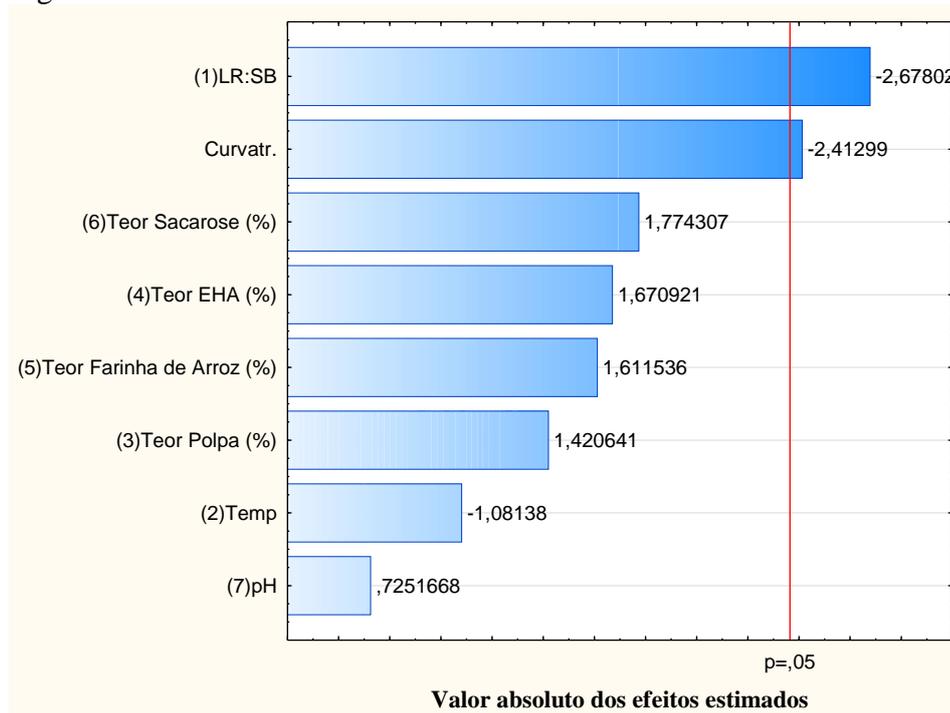
Fonte: autoral, 2022

Figura 2.9 - Gráfico de Pareto de Efeitos Padronizados - variável: CCT 12h



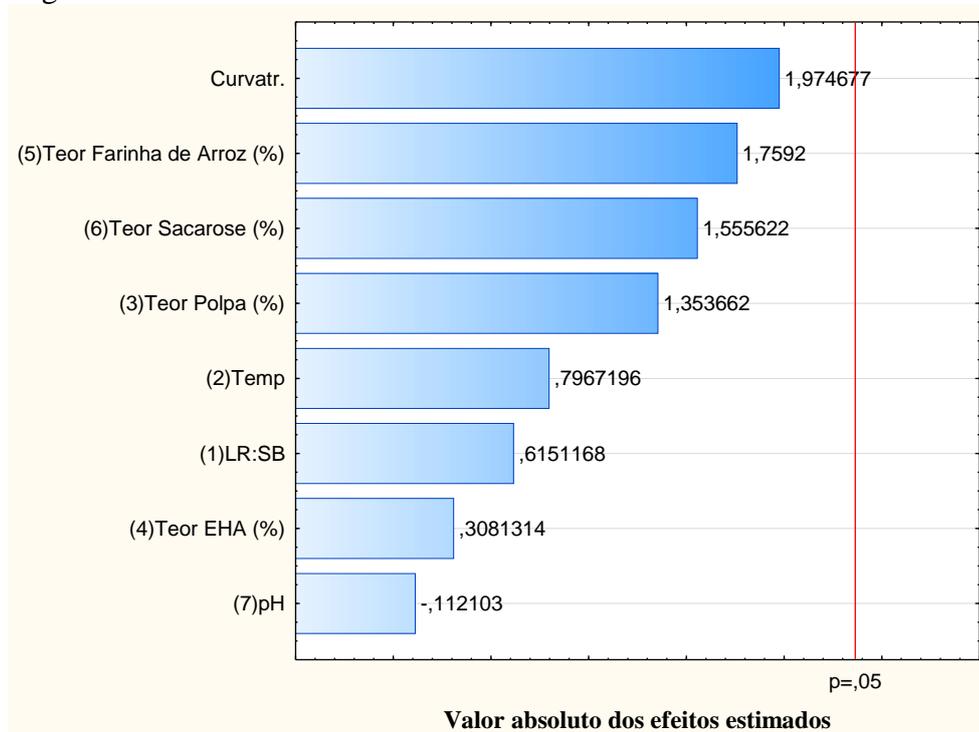
Fonte: autoral, 2022

Figura 2.10 - Gráfico de Pareto de Efeitos Padronizados - variável: AR 8h



Fonte: autoral, 2022

Figura 2.11 - Gráfico de Pareto de Efeitos Padronizados - variável: AR 12h



Fonte: autoral, 2022.

Figura 2.12 - Gráfico de Pareto de Efeitos Padronizados - variável: AT 8h

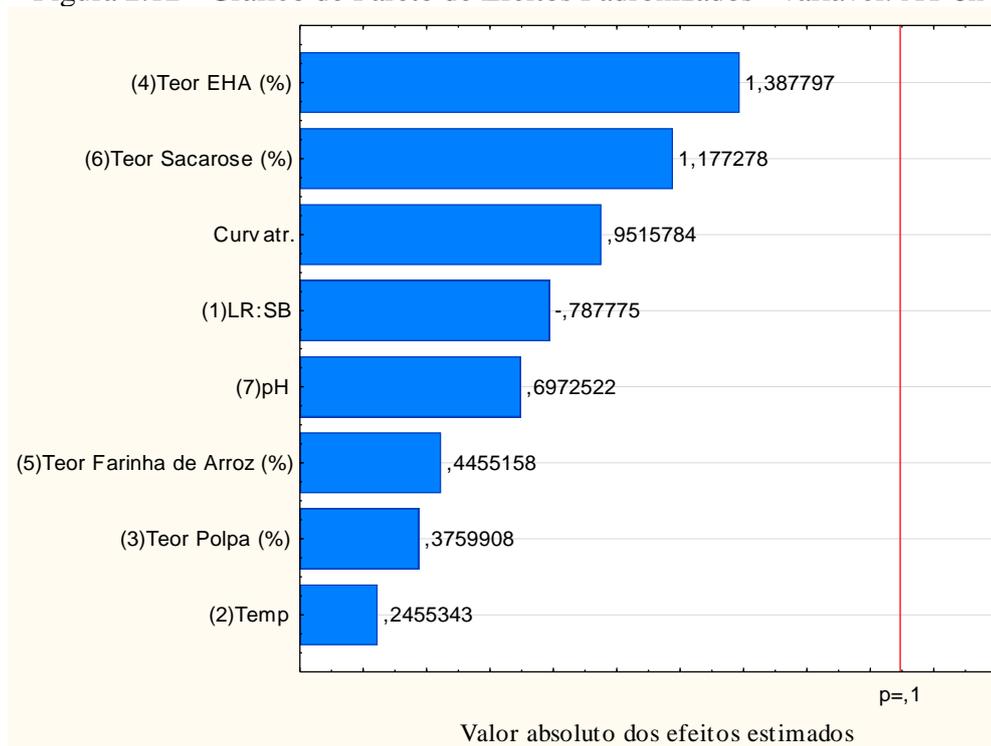


Figura 2.13 - Gráfico de Pareto de Efeitos Padronizados - variável: AT 12h

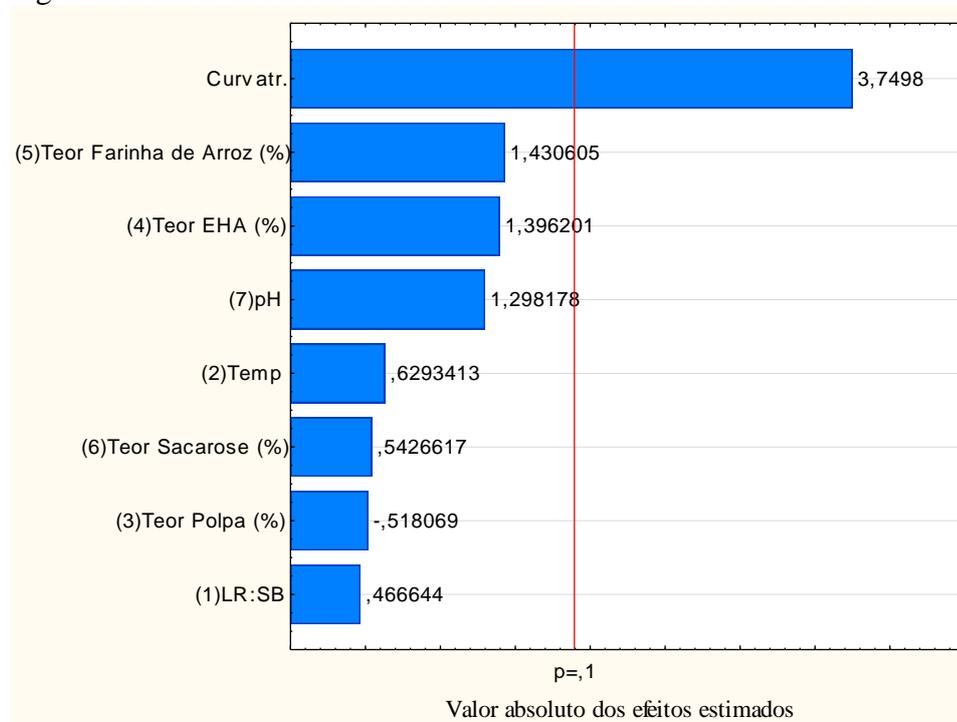
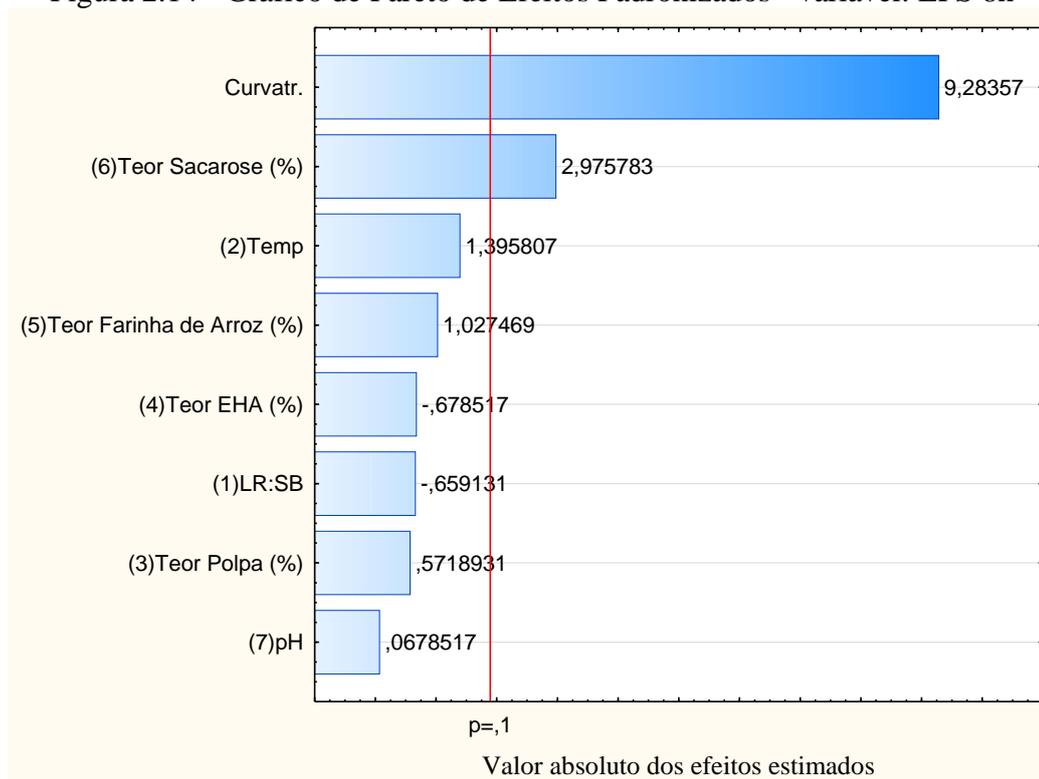
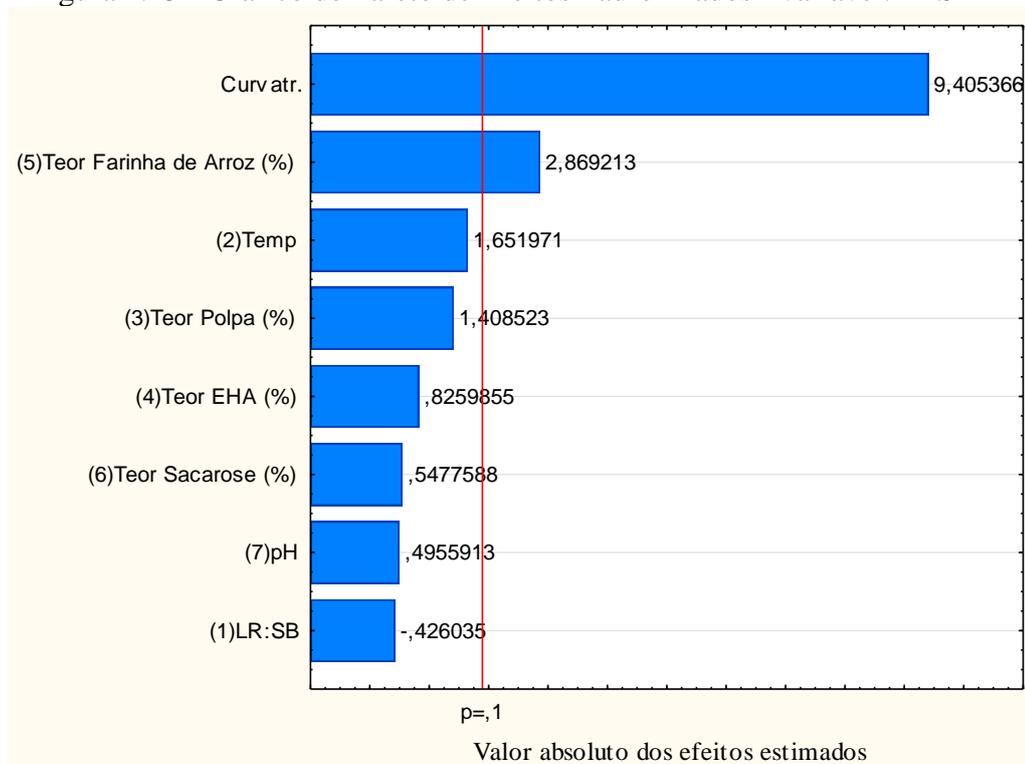


Figura 2.14 - Gráfico de Pareto de Efeitos Padronizados - variável: EPS 8h



Fonte: autoral, 2022

Figura 2.15 - Gráfico de Pareto de Efeitos Padronizados - variável: EPS 12h



Fonte: autoral, 2022

Figura 2.16 - Gráfico de Pareto de Efeitos Padronizados - variável: Ácido Lático 8h

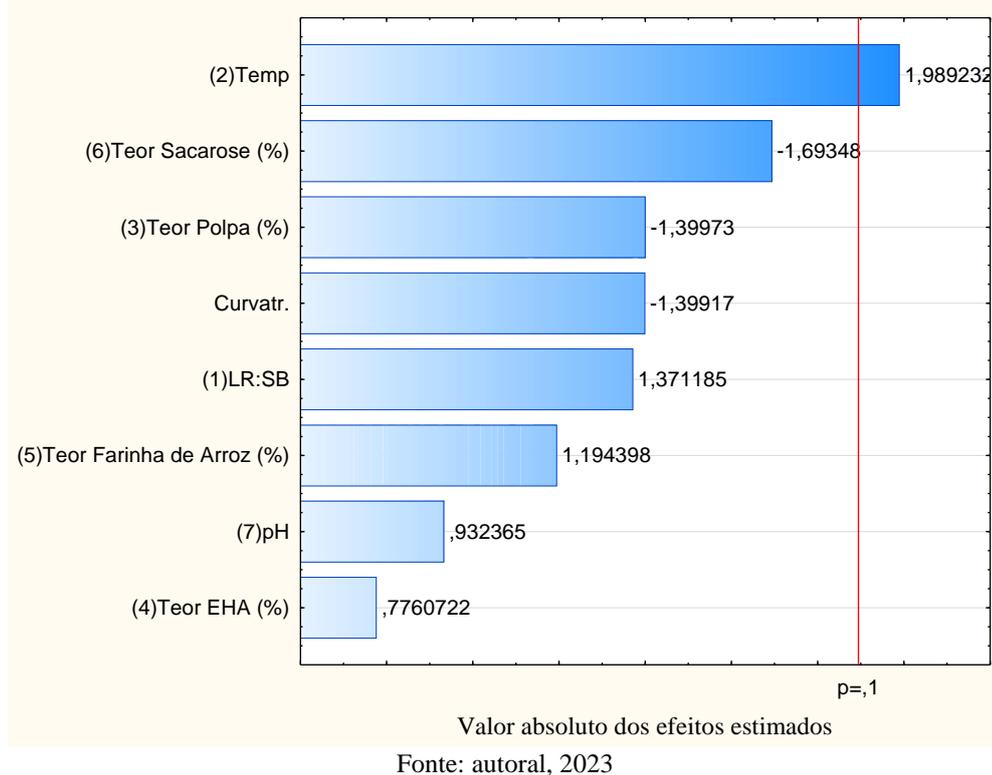


Figura 2.17 - Gráfico de Pareto de Efeitos Padronizados - variável: Ácido Acético 8h

