

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

Faculdade de Ciências Farmacêuticas

Programa de Pós-Graduação em Ciência dos Alimentos

Área de Bromatologia

Aplicação do subproduto de caju (*Anacardium occidentale*) em leite fermentado probiótico:
compostos bioativos, avaliação de grupos bacterianos no armazenamento, digestão e impacto
na microbiota intestinal

Igor Ucella Dantas de Medeiros

Tese para obtenção do Título de Doutor

Orientadora: Prof.^a Dr.^a Susana Marta Isay Saad

Co-orientadora: Prof^a Dr^a Katia Sivieri

São Paulo

2022

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

Faculdade de Ciências Farmacêuticas

Programa de Pós-Graduação em Ciência dos Alimentos

Área de Bromatologia

Aplicação do subproduto de caju (*Anacardium occidentale*) em leite fermentado probiótico:
compostos bioativos, avaliação de grupos bacterianos no armazenamento, digestão e impacto
na microbiota intestinal

Igor Ucella Dantas de Medeiros

Versão corrigida da Tese conforme Resolução CoPGr 6018

Tese para obtenção do Título de Doutor

Orientadora: Prof.^a Dr.^a Susana Marta Isay Saad

Co-orientadora: Prof^a Dr^a Katia Sivieri

São Paulo

2022

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico, para fins de estudo e pesquisa, desde que citada a fonte.

Ficha Catalográfica elaborada eletronicamente pelo autor, utilizando o programa desenvolvido pela Seção Técnica de Informática do ICMC/USP e adaptado para a Divisão de Biblioteca e Documentação do Conjunto das Químicas da USP

Bibliotecária responsável pela orientação de catalogação da publicação:
Marlene Aparecida Vieira - CRB - 8/5562

M488a Medeiros, Igor Ucella Dantas de
Aplicação do subproduto de caju (*Anacardium
occidentale*) em leite fermentado probiótico:
compostos bioativos, avaliação de grupos bacterianos
no armazenamento, digestão e impacto na microbiota
intestinal / Igor Ucella Dantas de Medeiros. - São
Paulo, 2021.
99 p.

Tese (doutorado) - Faculdade de Ciências
Farmacêuticas da Universidade de São Paulo.
Departamento de Alimentos e Nutrição Experimental.
Orientador: Saad, Susana Marta Isay
Coorientador: Sivieri, Katia

1. Probióticos. 2. Resíduos agroindustriais. 3.
Prebióticos. 4. Fitoquímicos. 5. Microbiota
intestinal. I. T. II. Saad, Susana Marta Isay,
orientador. III. Sivieri, Katia, coorientador.

Igor Ucella Dantas de Medeiros

Aplicação do subproduto de caju (*Anacardium occidentale*) em leite fermentado probiótico:
compostos bioativos, avaliação de grupos bacterianos no armazenamento, digestão e impacto
na microbiota intestinal

Comissão Julgadora
da
Tese para obtenção de título de doutor

Prof^a. Dr^a. Susana Marta Isay Saad
Orientadora / presidente

1º. examinador

2º. examinador

3º. examinador

4º. examinador

São Paulo, 18 de fevereiro de 2022

MEDEIROS, I. U. D. de. **Aplicação do subproduto de caju (*Anacardium occidentale*) em leite fermentado probiótico: compostos bioativos, avaliação de grupos bacterianos no armazenamento, digestão e impacto na microbiota intestinal.** 2021, 99p. Tese (Doutorado) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, 2021.

RESUMO

Subprodutos de polpa de frutas têm despertado interesse na pesquisa como substratos potencialmente funcionais aplicados em leites fermentados probióticos somando benefícios adicionais das fibras e dos compostos fenólicos. Nesse contexto, o caju (*Anacardium occidentale*) forma grande quantidade de fibras residuais após processamento agroindustrial com elevado potencial de utilização em novos alimentos. Objetivou-se avaliar aspectos físico-químicos do subproduto do caju desidratado (SC), aplicá-lo em formulação de leite fermentado com probiótico e *starter* pré-selecionados, avaliar aspectos físico-químicos, viabilidade, sobrevivência dos microrganismos, assim como o impacto das formulações na microbiota intestinal. O subproduto de caju fresco foi desidratado para se obter o SC. Para selecionar microrganismos das formulações de leite fermentado, a variação de população (Δ) em até 48 horas de fermentação de 13 cepas (*Lactobacillus* spp., *Limosilactibacillus* spp., *Lacticaseibacillus* spp., *Bifidobacterium* spp. ou *Streptococcus thermophilus*) foi avaliada em caldo MRS com 1% de SC. Uma cepa probiótica e *starter* mais adaptadas foram usadas em leites fermentados para as formulações Teste (FT, com SC) e Controle (FC, sem SC). Parâmetros funcionais e viabilidade das cepas em FT e FC foram avaliados durante armazenamento a 4°C por até 28 dias. Para a avaliação da sobrevivência das cepas incorporadas às formulações, a FT e a FC foram submetidas às condições gastrointestinais (GI) em modelo de simulação estático e dinâmico, este em Simulador do Ecossistema Microbiano Humano (SEMH®). No SEMH®, grupos bacterianos da microbiota intestinal foram quantificados utilizando técnicas dependente (ágar seletivo) e independente de cultivo (qPCR, pré-tratado com *propidium monoazide*). Foram, ainda, determinados compostos fenólicos, atividade antioxidante e composição de ácidos graxos nos reatores do cólon ascendente. O SC apresentou 63% de fibras insolúveis e 8,7% de solúveis, ácido graxo linolênico (2,0%), linoleico (3,3%) e oleico (48,1%). Compostos fenólicos totais (CFT) foram 486,6 equivalentes de ácido gálico (EAG)/100 g, evidenciando ácido siríngico (146,8mg/100 g) e ácido elágico (122mg/100g) além de elevada atividade antioxidante (AA), com 89% de inibição de DPPH· e IC_{50DPPH} de 1,16mg/mL. Cepa probiótica *Lacticaseibacillus paracasei* subsp. *paracasei* F-19® se destacou quanto ao potencial fermentativo no SC (>2,5logUFC/mL para Δ 24 e 48). *S. thermophilus* ST-M6® apresentou Δ 48 de 3,7 log UFC/ mL (superior às demais starters). Comparado à FC, a FT apresentou maior conteúdo de fibras insolúveis (1,78g/100 g), presença de ácido linolênico (8,6 μ g/g), além de valores superiores de CFT (>2200 mg EAG/100 g) e AA (>66% de inibição de DPPH·) durante todo o armazenamento. Ambas as formulações apresentaram tendência à acidificação progressiva (> 1,4 g ácido láctico/100 mL) e diminuição do pH (< 4,0). As cepas adicionadas em ambas as formulações tiveram viabilidade alta durante armazenamento (>8,0logUFC/mL). Durante a simulação das condições GI em modelo estático, a cepa F-19® na FT apresentou população >6,0logUFC/mL na fase estomacal em todos os dias de armazenamento, assim como uma melhor recuperação após a fase entérica II nos dias 7 e 28 (>4,5log UFC/mL). Por outro lado, a FC apresentou melhores resultados de sobrevivência da F-19® na simulação em modelo dinâmico SEMH® (5,8 e 7,0logUFC/mL, respectivamente após fases gástrica e entérica). A técnica de semeadura em ágar revelou um aumento significativo ($p<0,01$) da população de *Lactobacillus* spp. apenas durante a administração da FT no SEMH®. Por outro lado, por qPCR, ambos tratamentos obtiveram aumento ($p<0,01$) para F-19® (\uparrow 40%), *Lactobacillus* spp. (\uparrow 20%), *Bifidobacterium* spp. (\uparrow 7%) e Actinobacteria (\uparrow 20%). Foi observada diminuição ($p<0,01$) para *Clostridium* cluster I (\downarrow 18%) e γ -Proteobacteria (\downarrow 12% somente para FC). Mesmo após a finalização dos tratamentos certa resiliência à manutenção de valores altos para *L. paracasei* e baixos para *Clostridium* cluster I e γ -Proteobacteria foram observados. Uma inversão na proporção Firmicutes e Bacteroidetes também foi observada pós-tratamento com FC. A presença de FT nos reatores incrementou ($p<0,01$) em CFT (61,7mgEAG/100g) e AA (39,3% de inibição de DPPH·) e presença de ácido rumênico e linolênico. Conclui-se que o SC resultou em boa viabilidade de *L. paracasei* F-19® em leite fermentado, além de acrescer atividade antioxidante e compostos fenólicos. Abre-se caminho para que a associação subproduto de caju e probiótico (F-19®) no leite fermentado formulado seja um simbiótico sinérgico, com posterior avaliação em ensaios clínicos para verificar benefícios mais consistentes à saúde do hospedeiro.

Palavras-chave: Probióticos, Resíduos agroindustriais, Frutas tropicais, Prebióticos, Fitoquímicos, Microbiota intestinal

MEDEIROS, I. U. D. de. **Application of cashew (*Anacardium occidentale*) by-product in probiotic fermented milk: bioactive compounds, evaluation of bacterial groups during storage, digestion and impact on the intestinal microbiota.** 2021, 99p. Thesis (PhD) – School of Pharmaceutical Sciences, University of São Paulo, 2021.

ABSTRACT

Fruit by-products have aroused interest in research as potentially functional substrates in the formulation of probiotic fermented milks by adding benefits from fiber and phenolic compounds. In this context, cashew (*Anacardium occidentale*) forms a large amount of residual fibers after agroindustry processing with high potential for use in new foods. This thesis aimed to evaluate physicochemical aspects of the dehydrated cashew by-product (CBP), apply it in fermented milk formulations with pre-selected probiotics and starters, evaluate physicochemical aspects, viability and survival of microorganisms as well as the impact of the formulations on the intestinal microbiota. Fresh cashew by-product was dehydrated to obtain CBP. As for the selection of microorganisms for the formulation of fermented milk, the population variation (Δ) within 48 hours of fermentation of 13 strains (*Lactobacillus* spp., *Limosilactibacillus* spp., *Lacticaseibacillus* spp., *Bifidobacterium* spp. or *Streptococcus thermophilus*) was evaluated in MRS broth with 1% CBP. A more adapted probiotic and starter strain were used in fermented milks for the Test (TF, with CBP) and the Control (CF, without CBP) Formulations. Functional parameters and the viability and of strains in TF and CF were evaluated in storage at 4° C during 28 days. The survival of the strains into the formulations were accessed in gastrointestinal (GI) conditions in a static and a dynamic GI model, the latter using a Simulator of the Human Intestinal Microbial Ecosystem (SHIME®). In the dynamic model, bacterial groups of the intestinal microbiota were quantified using dependent (selective agar) and culture-independent (qPCR, pretreated with propidium monoazide). Phenolic compounds, antioxidant activity, and fatty acid composition in the ascending colon reactors were also determined. CBP presented 63% and 8.7%, respectively, of insoluble and soluble fibers and the fatty acids linolenic (2.0%), linoleic (3.3%), and oleic (48.1%) acids. Total phenolic compounds (TPC) were 486.6 gallic acid equivalents (AGE)/100 g, evidencind syringic acid (146.8mg/100g), ellagic acid (122mg/100g) as well high antioxidant activity (AA) (89% inhibition of DPPH· and IC_{50DPPH} of 1.16mg/mL). The probiotic strain *Lacticaseibacillus paracasei* subsp. *paracasei* F-19® stood out in terms of CBP fermentation potential (>2.5log CFU/mL in Δ 24 and 48). *Streptococcus thermophilus* ST-M6® had Δ 48 of 3.7logCFU/mL (superior to the other starters). Compared to CF, TF had a higher content of insoluble fibers (1.8g/100 g), linolenic acid (8.6µg/g), higher values of TPC (>2200 mg AGE/100 g) and AA (>66% DPPH· inhibition) throughout storage. Both formulations tended to progressively acidify (>1.4g lactic acid/100 mL) and decrease in pH (<4.0). The strains added to both formulations had high viability during storage (>8.0log CFU/mL). Throughout the GI simulation conditions in static model, the F-19® strain in the TF showed populations above 6.0 logCFU/mL in the stomach phase on all days of storage, as well as a better recovery after the enteric phase II on days 7 and 28 (>4.5 log CFU/mL). Oppositely, CF presented better survival results for F-19® in the SHIME® dynamic model simulation (5.8 and 7.0log CFU/mL, respectively, after the gastric and the enteric phases). The agar conventional technique revealed a significant increase ($p<0.01$) in the population of *Lactobacillus* spp. only during the administration of TF in SHIME®. However, by qPCR, both treatments (FC and FT) increased ($p<0.01$) for F-19® (↑40%), *Lactobacillus* spp. (↑20), *Bifidobacterium* spp. (↑7%) and Actinobacteria (↑20). A decrease ($p<0.01$) was also observed to *Clostridium* cluster I (↓18%) and γ -Proteobacteria (↓12% only for CF). After the completion of treatment with FC and FT in SHIME®, some resilience to the maintenance of high values for *L. paracasei* and low values for *Clostridium* cluster I and γ -Proteobacteria were observed. An inversion in the Firmicutes and Bacteroidetes values was also observed after CF treatment. Moreover, the presence of TF in SHIME® showed an increase ($p<0.01$) in CFT (61.7mg EAG/100g) and AA (39.3% inhibition of DPPH·), in addition to the presence of rumenic acid and linolenic acid. It is concluded that the dehydrated cashew by-product resulted in good viability of *L. paracasei* F-19® in fermented milk and increasing antioxidant activity and phenolic compounds as well. This opens the way for this association of cashew by-product and probiotic (F-19®) in formulated fermented milk to be a synergistic synbiotic. But still is need further investigation in clinical trials to attest relevant benefits to the host's health.

Keywords: Probiotics, Agro-industrial waste, Tropical fruits, Prebiotics, Phytochemicals, Intestinal microbiota

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1	- Representação do Simulador do Ecossistema Microbiano Humano (SEMH®).....	21
Figura 2	- Fluxograma de produção do leite fermentado com e sem adição de subproduto de caju desidratado.....	38
Figura 3	- Esquematização do Microbiano Intestinal Humano (SEMH®) usado no presente estudo.....	42
Figura 4	- Protocolo metodológico do SEMH®, subdividido em fases e experimentos.....	44
Figura 5	- Análise de componentes principais dos filos, gêneros e espécies bacterianas durante fases e experimentos no SEMH®	74
Figura 6	- Composição de fenólicos totais e capacidade antioxidante ao radical DPPH dos experimentos no SEMH®	76

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	- Microrganismos avaliados no presente estudo e suas condições de cultivo para cada cepa.....	36
Tabela 2	- Proporção de ingredientes usados na formulação dos leites fermentados.....	37
Tabela 3	- Condições de cultivo para contagem de grupos de microrganismos de interesse durante fases de experimento em SEMH®	45
Tabela 4	- <i>Primers</i> utilizados para a quantificação de células viáveis de diferentes níveis taxonômicos bacterianos por qPCR.....	48
Tabela 5	- Parâmetros de reagentes e termociclagem utilizados para quantificação de células viáveis em diferentes níveis taxonômicos bacterianos por qPCR.....	49
Tabela 6	- Composição centesimal, pH e acidez do subproduto de caju desidratado.....	51
Tabela 7	- Compostos fenólicos totais, perfil de fenólicos e atividade antioxidante.....	53
Tabela 8	- Composição de ácidos graxos do óleo extraído de subproduto de caju desidratado.....	53
Tabela 9	- Variação de população dos microrganismos probióticos após 48 horas de fermentação no caldo MRSm com subproduto de caju e em comparação ao grupo controle.....	59
Tabela 10	- Variação de população dos microrganismos probióticos após 48 horas de fermentação no caldo MRSm com e sem subproduto de caju.....	55
Tabela 11	- Variação de população dos microrganismos probióticos após 24 horas de fermentação no caldo MRSm com subproduto de caju.....	55
Tabela 12	- Variação de população dos microrganismos probióticos após 24 horas de fermentação no caldo MRSm com e sem subproduto de caju.....	56
Tabela 13	- Variação de população dos microrganismos <i>starter</i> entre 24 e 48 horas de fermentação no caldo MRSm com e sem subproduto de caju.....	56
Tabela 14	- Variação de população dos microrganismos <i>starter</i> após 48 horas de fermentação no caldo MRSm com e sem subproduto de caju.....	57
Tabela 15	- Variação de população dos microrganismos <i>starter</i> após 24 horas de fermentação no caldo MRSm enriquecido com e sem subproduto de caju.....	58
Tabela 16	- Variação de população dos microrganismos <i>starter</i> entre 24 e 48 horas de fermentação no caldo MRSm enriquecido com e sem subproduto de caju.....	58
Tabela 17	- Viabilidade (log UFC/ mL) de cepas probiótica e <i>starter</i> em leite fermentado com e sem adição de subproduto de caju durante 28 dias em refrigeração.....	59

Tabela 18	- Valores de pH e acidez titulável em leite fermentado com e sem adição de subproduto de caju durante manutenção por 28 dias em refrigeração.....	61
Tabela 19	- Composição centesimal (média ± desvio padrão) dos leites fermentados FC (formulação controle) e FT (formulação com sub produto de caju).....	62
Tabela 20	- Composição de ácidos graxos das formulações de leites fermentado probiótico.....	63
Tabela 21	- Compostos fenólicos totais e atividade antioxidante das formulações de leite fermentados durante armazenamento refrigerado.....	64
Tabela 22	- Sobrevida (log UFC/ mL) durante as condições gastrointestinais simuladas no sistema <i>in vitro</i> estático de <i>Lacticaseibacillus paracasei</i> subsp. <i>paracasei</i> F-19® em leites fermentados com e sem subproduto de caju.....	66
Tabela 23	- Sobrevida (log UFC/ mL) de <i>Lacticaseibacillus paracasei</i> subsp. <i>paracasei</i> F-19® em leites fermentados com e sem subproduto de caju durante as condições gastrointestinais simuladas no sistema <i>in vitro</i> dinâmico SEMH®.....	67
Tabela 24	- Sobrevida (log UFC/ mL) durante condições gastrointestinais simuladas no sistema <i>in vitro</i> estático de <i>Streptococcus thermophilus</i> ST-M6® em leites fermentados com e sem subproduto de caju.	67
Tabela 25	- Quantificação de grupos microbianos (log UFC/mL) por método de plaqueamento após uso de leite fermentado probiótico sem SC no SEMH® (Experimento 1).....	69
Tabela 26	- Quantificação de grupos microbianos (log UFC/mL) por método de plaqueamento após uso de leite fermentado probiótico com SC no SEMH® (Experimento 2).....	69
Tabela 27	- Grupos bacterianos antes, durante e após alimentação do SEMH® com leite fermentado probiótico sem subproduto de caju (Experimento 1).....	70
Tabela 28	- Grupos bacterianos antes, durante e após alimentação do SEMH® com leite fermentado probiótico com subproduto de caju (Experimento 2).....	71
Tabela 29	- Composição de ácidos graxos das formulações de leite fermentado FC e FT e dos líquidos dos reatores durante as fases do experimento no SEMH®	78

AGRADECIMENTOS

Agradecer é uma contingência do lembrar. Dos desafios que foi trilhar esse caminho de pós-graduação, das vitórias, das tristezas, das alegrias, das oportunidades, das perdas... Uma jornada de auto-descoberta se trilhou nesses anos em que eu pude pesquisar, aprofundar, descobrir... mas também me pesquisar, me aprofundar e me descobrir. No fundo, sou grato...

Sou grato à energia cósmica e avassaladora que move a nossa existência. Deus, ou força superior, ou nada, ou tudo. Sou grato pela minha existência como ser consciente.

Sou grato à minha família. Meus pais, meus irmãos e meu marido. Elsa, Eurípedes, Iris, Ivan e Rhod. Obrigado por estarem do meu lado, serem um porto seguro para as minhas inseguranças, pelo amor e pela admiração, que é mútua. Ter vocês no meu cotidiano, mesmo na distância física, foi, é e sempre será um tesouro sem precedentes.

Sou grato aos meus amigos. Lembrar de todos aqueles que junto trilharam essa jornada acadêmica é sorrir também. Raquel, Carols, Mercelittle, Luiz, Andyy, Neinzinha, Diogo, Thazes, Marina, Marcos, Bia, Raphs, Ana Clara, Juliana. Mais que amigos de laboratório, “labfriends”! Esses estiveram mais próximos à mim, os conheci aqui em São Paulo e faziam parte da base de pesquisa. Me ajudaram em dificuldades metodológicas, foram braço direito para que pudesse desopilar e estravazar as frustrações do dia-a-dia de pesquisa. Foram muitos “lanchos”, HH’s, desabafos, multirão de análises... sempre juntos... até no dia de almôndega no almoço do bandex.

Sou grato às amigas de Natal. Natie e May! Amigas que também vieram da nossa terra natal e trilharam caminhos acadêmicos parecidos. Muitas gargalhadas foram garantidas. Muitas conversas reconfortantes, tapiocas e cuscuz. Ter o sotaque, as mungangas, as marmotices que tanto nos representam era um conforto ainda maior nessa jornada.

Sou grato às parcerias e orientações. Primeiramente à professora Susana Saad, pela oportunidade de desenvolver essa pesquisa, pelo apoio para dar alicerce a ela. A oportunidade que ela me deu, no próprio doutorado e no aprendizado de como ele me representa profissionalmente, é inegável. E ainda por cima pude aplicar o que aprendi e aprendo na minha profissão atual como professor universitário.

Sou grato à minha co-orientadora, Katia Sivieri do campus de Araraquara da UNESP. Pela oportunidade de aprofundar meu estudo com o uso do SEMH®, por me permitir conhecer essa cidade com cheiro de laranja, e claro, conhecer novos amigos, o Matheus, Fernanda e Ana Luiza que estavam mais próximos. Todos me ajudaram bastante a usar o equipamento, a projetar melhor meu experimento, fazer coletas; e o mais importante, me fizeram sentir em casa.

Sou grato ao conjunto de mentes pensantes que formam a pós-graduação em Ciência de Alimentos da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da USP. Aos professores, técnicos, colegas e amigos de outras bases de pesquisa o meu profundo obrigado. Menção especial faço à professora Inar Castro e Inés Genovese pelo auxílio metodológico para quantificação de ácidos graxos e compostos fenólicos, mesmo em momentos de pandemia.

Sou grato finalmente à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (Capes) pela bolsa mensal (processos 88882.376975/2019-01 e 88887.634349/2021-00) e à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pelo subsídio financeiro (Projeto #2013/50506-8).

A gratidão gira em torno de querer fazer um mundo melhor. E dessa forma, aprender a ser uma pessoa melhor e gerar conhecimento. O conhecimento é feito por pessoas e para transformar a vida de pessoas. E isso, tenho certeza, aconteceu nesse trajeto do meu doutorado.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	13
1.1 Alimentos benéficos à saúde.....	13
1.2 Definições e perspectivas sobre alimentos fermentados, probióticos prebióticos e simbióticos.....	14
1.3 Fruticultura tropical, formação e uso de subprodutos de caju como alimentos funcionais relacionados à microbiota intestinal.....	17
1.4 Compreensão e investigação da microbiota intestinal associado ao uso de subprodutos de fruta.....	19
1.5 Fitoquímicos de subprodutos de frutas e sua relação com a microbiota intestinal e atividade antioxidante.....	21
1.6 Subprodutos da fruta e sua potencialidade prebiótica aliado à probióticos.....	26
2. OBJETIVOS.....	29
2.1 Objetivo geral.....	29
2.2 Objetivos específicos.....	29
3. MATERIAIS E MÉTODOS.....	30
3.1 Matriz vegetal desidratada.....	30
3.2 Caracterização físico-química do Subproduto de Caju.....	31
3.3 Avaliação do perfil de ácidos graxos do Subproduto de Caju.....	31
3.4 Extrações para composição bioativa de Subproduto de Caju.....	33
3.5 Determinação de fenólicos totais e perfil de compostos fenólicos do Subproduto de Caju.....	33
3.6 Potencial antioxidante em DPPH· (2,2-difenil-1-picrihIdrazil) do Subproduto de Caju.....	34
3.7 Fermentabilidade in vitro de bactérias probióticas e starter no Subproduto de Caju.....	34
4. PREPARAÇÃO DAS FORMULAÇÕES DE LEITE FERMENTADO E PERÍODOS DE AMOSTRAGEM.....	36
4.1 Composição físico-química e centesimal dos leites fermentados.....	39
4.2 Avaliação do perfil de ácidos graxos, compostos fenólicos totais e atividade antioxidante dos leites fermentados.....	39
4.3 Determinação da viabilidade dos microrganismos no leite fermentado durante armazenamento.....	40
4.4 Viabilidade de microrganismos durante condições gastrointestinais in vitro.....	40
5. AVALIAÇÃO DOS LEITES FERMENTADOS NO SEMH®.....	41
5.1 Especificações e protocolo de análises em SEMH®	41
5.2 Avaliação do perfil de ácidos graxos, compostos bioativos e atividade antioxidante dos conteúdos dos reatores do SEMH®	44

5.3 Análises microbiológicas do SEMH®.....	
5.4 Preparo das amostras para análises da microbiota intestinal por PCR quantitativo (qPCR).....	45
6. ANÁLISES ESTATÍSTICAS.....	50
7. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	51
7.1 Características fisico-químicos e funcionais do subproduto de caju (S.C).....	51
7.2 Testes microbiológicos de fermentabilidade em SC e escolha do microrganismo probiótico....	53
7.3 Viabilidade dos microrganismos utilizados nos leites fermentados durante o armazenamento refrigerado.....	58
7.4 Composição centesimal e funcional dos leites fermentados.....	61
7.5 Sobrevida dos microrganismos em leites fermentados às condições gastrointestinais em modelo estático e dinâmico.....	65
7.6 Contagem microbiológica, perfil de microbiota por qPCR em SEMH®.....	68
7.7 Compostos fenólicos, atividade antioxidante e perfil de ácidos graxos em SEMH®.....	76
8. CONCLUSÕES.....	80
9. SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS.....	81
REFERÊNCIAS.....	82
ANEXOS.....	95
APÊNDICES.....	97

1. INTRODUÇÃO

1.1 Alimentos benéficos à saúde.

Atualmente a pesquisa e desenvolvimento de alimentos com foco na saudabilidade se ampara cada vez mais em tendências de praticidade, confiabilidade e sustentabilidade na tentativa de atender às demandas de consumidores cada vez mais exigentes (SKAF et al., 2010). Nesse contexto, o conceito de alimento mais saudável ou “funcional” nasceu no Japão, em 1991, e atualmente é amplamente utilizado para promover alegações de saúde e atender objetivos de marketing (SIRÓ et al., 2008).

Alimentos funcionais são aqueles que desencadeiam modulações fisiológicas e redução dos riscos de doenças crônicas quando consumidos regularmente e associados a outros hábitos de vida saudáveis (DOMÍNGUEZ-DÍAZ; FERNÁNDEZ-RUIZ; CÁMARA, 2020; FARAG et al., 2020). Dentro desse grupo, alimentos têm sido amplamente estudados, em virtude de sua função geral de melhorar a saúde intestinal ou, mais especificadamente, em regular a microbiota intestinal (FARIAS et al., 2019, PADILHA et al. 2016).

Além do termo alimento funcional, outro termo usado em muitos estudos é voltado aos “compostos biogênicos”, como peptídeos, flavonóides e carotenóides, que são moléculas biologicamente ativas e favorecem o hospedeiro por imunomodulação direta, supressão de mutagênese, tumorigênese, peroxidação ou deterioração intestinal associada à inflamação e disbiose (DA SILVA et al., 2016). A associação de alimentos funcionais e/ ou seus compostos biogênicos pode ser uma boa estratégia para melhorar o equilíbrio da microbiota intestinal, aumentando a multiplicação de bactérias benéficas e inibindo microrganismos prejudiciais (IEBBA et al., 2016; FRAGA; CROFT; KENNEDY, 2019; HILL et al., 2014).

Compreender os mecanismos de como novos compostos podem modular a microbiota intestinal levanta ainda mais demandas como as relacionadas à sustentabilidade. Isso porque o uso de subprodutos de frutas torna-se cada vez mais uma alternativa, visto a alta taxa de descarte (30% do peso da fruta de origem), em que cascas, bagaço, sementes ou caroços são desprezados (ESPARZA et al., 2020; MEDEIROS et al., 2019). No entanto, os subprodutos de vários tipos de frutas contêm numerosos compostos bioativos, como carotenóides, melatonina, compostos fenólicos e fibras alimentares (STRUCK et al., 2016; HANG et al., 2018; MATEOS-APARICIO et al., 2020). Dessa forma, os subprodutos de frutas podem ser adicionados em sua integralidade ou ter seus fitoquímicos separados e utilizadas em produtos enriquecidos ou mesmo funcionais (CORRÊA et al. 2017; GIL-SÁNCHEZ et al. 2017).

Nesse âmbito, os estudos com subprodutos de frutas podem ser alocados em três nichos, de acordo com suas abordagens funcionais ou biogênicas relacionadas à microbiota intestinal: a) aqueles realizados com extratos de compostos isolados para a avaliação da atividade *in vitro* ou *in vivo*; b) uso de subprodutos desidratados na forma de farináceos na modulação da microbiota intestinal, considerando-se, nesse caso, a interação de seus constituintes inatos; e c) aqueles que empregam extratos concentrados ou farináceos dos subprodutos como ingredientes em alimentos probióticos, avaliando sua capacidade de aumentar o valor nutricional e funcional original (ZHU et al., 2015; TOMÁS-BARBÉRAN, et al. , 2017).

De acordo com o apresentado, fica evidente que os resíduos produzidos pela indústria de processamento de sucos de frutas podem ser fontes promissoras de compostos biogênicos e/ ou bioativos. A necessidade de maiores pesquisas para explorar suas potencialidades como uma nova opção de ingredientes funcionais com ganhos ambientais e econômicos se alinha com as tendências na busca de alimentos mais saudáveis (BERES et al., 2017; ESPARZA et al. 2020).

1.2 Definições e perspectivas sobre alimentos fermentados, probióticos prebióticos e simbióticos

Conforme mencionado anteriormente, diversos tipos de alimentos são estudados quanto à sua abordagem funcional para melhorar a qualidade e o bem-estar humano, como, por exemplo, os alimentos ou suplementos que possam modular a microbiota gastrointestinal (TRIPATHI; GIRI, 2014). A indústria tem explorado essa relação, promovendo o consumo de alimentos com essas características (SAAD et al., 2013).

Recentemente, os conceitos que relativo às propriedades funcionais dos alimentos quanto à sua potencialidade prebiótica, probiótica e simbiótica foram esclarecidos em acordos internacionais. A *International Scientific Association of Probiotics and Prebiotics* (ISAPP) trouxe consenso sobre esses termos, incluindo a concepção de alimento fermentado e como e quando ele poderia ser considerado um probiótico.

Em um contexto bioquímico, o processo de fermentação pode ser definido como um processo que forma ATP, com a utilização de compostos orgânicos como receptores e doadores de elétrons. No entanto, embora seja válido para alguns tipos de alimentos e bebidas fermentados, esse conceito não abrange todos. Desta forma, o painel do ISAPP define alimentos e bebidas fermentados como: “alimentos feitos através da multiplicação microbiana desejada com conversões enzimáticas de componentes alimentares” (MARCO et al., 2021).

É importante observar que o alimento fermentado não é necessariamente um probiótico. De acordo com o mesmo instituto, o termo probiótico deve ser usado quando um benefício à

saúde pode ser demonstrado e atribuído direta ou indiretamente a microrganismos vivos bem definidos e caracterizados, independentemente do valor nutricional da matriz alimentar (MARCO et al., 2021, HILL et al., 2015). Um alimento probiótico é aquele com “microrganismos vivos que, quando administrados em quantidades adequadas, conferem benefícios à saúde do hospedeiro” (HILL et al., 2014). Nesse contexto, a sobrevivência desses microrganismos no alimento em questão é essencial. Apesar de não haver consenso internacional de dose fisiológica para implicar benefício probiótico, instituições e pesquisadores tem sugerido que populações variando de 10^6 a 10^9 Unidades Formadoras de Colônias UFC por g ou porção do alimento poderiam auxiliar na manutenção de uma microbiota intestinal mais saudável (GALLINA et al., 2010; HILL et al., 2014).

Ainda de acordo com o painel da ISAPP, um alimento pode ser prebiótico quando possui substratos em sua constituição que são utilizados seletivamente pelos microrganismos do hospedeiro, conferindo benefícios à saúde (GIBSON et al., 2017). Adicionalmente, pode haver associação de probióticos e prebióticos, em uma formulação chamada simbiótica. Nesta última definição, um simbiótico pode ser “complementar” quando a combinação de probióticos e prebióticos já comprovados atuam no hospedeiro para alcançar benefícios à saúde. Adicionalmente o simbiótico pode ser "sinérgico" quando um substrato é seletivamente utilizado pelo microrganismo coadministrado, e esse ou sua associação como substrato proverá benefícios para a saúde do hospedeiro (SWANSON et al., 2020). Essa diferenciação permite uma compreensão mais ampliada sobre alimentos simbióticos; em que não necessariamente os substratos e ou os microrganismos presentes precisam atender aos critérios de prebióticos e probióticos, respectivamente. Essa concepção simbiótica é interessante para estimular a pesquisa e desenvolvimento de alimentos com adição de substratos nutritivos não convencionais, como por exemplo na matriz complexa e fibrosa de subprodutos de fruta.

Todos esses consensos concordam com a importância da microbiota gastrointestinal no bem-estar e na saúde dos hospedeiros humanos. Assim, efeitos benéficos são esperados pelo consumo regular de produtos lácteos fermentados e ou adicionados com bactérias probióticas assim como quando adicionados de outros substratos com funcionalidade prebiótica (MARCO et al., 2020; SWANSON et al., 2020). Com o equilíbrio e a adequação da microbiota intestinal pelo consumo habitual desses alimentos, ocorre, também, a regulação do sistema imunológico e o reforço da barreira intestinal ao diminuir a adesão e a multiplicação de microrganismos patogênicos (ZENDEBOODI et al., 2020, INDIRA et al., 2019).

Dentro dos alimentos fermentados com potencialidade probiótica mais consumidos mundialmente, aqueles advindos de matriz láctea são os mais associados com redução de risco

de certas doenças (HILL et al., 2014). Nesse cenário iogurtes, leites fermentados, sobremesas lácteas, *frozen yogurt* entre outros emergem como alvo de pesquisa para desenvolvimento de alimentos probióticos, prebióticos ou simbióticos.

No Brasil, leites fermentados são definidos como “produtos obtidos por coagulação e redução do pH do leite, adicionados de outros produtos lácteos ou substâncias alimentares e fermentados pela ação de uma ou mais dos seguintes cultivos: *Lactobacillus acidophilus*, *Lacticaseibacillus casei*, *Bifidobacterium* spp., *Streptococcus salivarius* subsp. *thermophilus* e/ou outras bactérias lácticas que contribuem para a determinação das características do produto final” (BRASIL, 2007).

Atualmente, os leites fermentados já estão disponíveis nas mais diferentes variedades que atendem a padrões de sabor e estilo de vida. No entanto, novas demandas por produtos mais saudáveis e funcionais tornam o leite fermentado alvo de pesquisas para o desenvolvimento de produtos que gerem benefícios à saúde da microbiota intestinal. Para isso, pode ocorrer a utilização de substratos prebióticos, ou mesmo microrganismos probióticos, tanto individualmente quanto em combinação (simbióticos).

Muitos estudos têm demonstrado que microrganismos probióticos e fibras prebióticas podem ser usados de forma satisfatória em diferentes matrizes de leite, como iogurte, sorvete e bebidas (BURITI; BEDANI; SAAD, 2016). Outros estudos se concentraram na produção e avaliação de microrganismos em novos produtos lácteos probióticos, prebióticos ou simbióticos, incluindo bebidas ou sobremesas lácteas à base de frutas (VALENCIA et al., 2016; ALBUQUERQUE et al., 2019; XAVIER et al., 2019). Considerando que o leite fermentado pode ser um veículo para microrganismos probióticos, a possibilidade de incorporação de substrato contendo fibras de subprodutos de frutas tropicais merece ser avaliada e pode se amparar no conceito de simbiótico sinérgico.

Dessa maneira, estudos são bem-vindos e devem se concentrar na combinação de culturas probióticas com fibras alimentares distintas na produção de produtos lácteos fermentados. Esses estudos deveriam ser dirigidos, no sentido de abranger a avaliação de seus parâmetros de identidade e qualidade ao longo do armazenamento, da sobrevivência dos microrganismos às condições do trânsito gastrointestinal e na avaliação propriamente dita da capacidade de modulação da microbiota intestinal em sistemas simulados (FREIRE et al., 2017; GARCÍA-VILLALBA et al., 2017; BURITI; CASTRO; SAAD, 2016).

1.3 Fruticultura tropical, formação e uso de subprodutos de caju como alimentos funcionais relacionados à microbiota intestinal

A produção global de frutas tem grande impacto no primeiro setor e traz grandes lucros ao redor do mundo. A produção mundial de safras selecionadas durante 2008-2018 ultrapassou 10,6 bilhões de toneladas, compreendendo 240 milhões de toneladas de frutas tropicais (FAOSTAT, 2020). Tomates, bananas, melancias, maçãs, uvas e laranjas foram as seis maiores safras do mundo, seguidas por frutas de clima subtropicais/ temperado (tangerina, pera, pêssego, azeitona, ameixa, toranja e várias frutas vermelhas) e tropicais (caju, manga, goiaba, melão, abacaxi, etc) (FAOSTAT, 2020).

A Ásia e a América do Sul compreendem os maiores produtores de frutas, liderados por Brasil, China e Índia. A fruticultura brasileira, com ênfase nas frutas tropicais, é uma das mais diversificadas do mundo, com 2 milhões de hectares de extensão, gerando cerca de 5 milhões de empregos no agronegócio (BRASIL, 2017). Infelizmente a concentração de recursos para uma produção mais sustentável recai mais na citricultura, enquanto que a produção de frutas frescas, como no caso do caju ainda carecem de uma abordagem eficaz para integrar a produção de alta qualidade.

Nesse cenário produtivo as frutas utilizadas na produção de bebidas têm maior destaque. Por exemplo, a uva tem sua produção aumentada proporcionalmente ao consumo de vinho e suco e uva, levando a um aumento concomitante na produção de cascas, sementes e outros resíduos (BERES et al., 2018). Esse pensamento pode ser aplicado a outros frutos como tomate, maçã e frutas tropicais que também são tradicionalmente processados na extração de suco ou polpa e, com isso, geram valores superiores a 30% de resíduos. A exemplo disso tem-se a formação de resíduos em quantidades de 50% para laranja, 40-60% para maracujá, 33% para abacaxi, 40-50% para manga e até 90% para pseudofruto do caju (visto o aproveitamento preferencial da castanha) (SÁYAGO-AYERDI; ZAMORA-GASGA; VENEMA, 2019; BUSSOLO DE SOUZA et al., 2018; KAPRASOB et al., 2018; SAH et al., 2016; FIORDA et al., 2016; ROMERO-LOPEZ et al., 2011).

Essa condição paradoxal, da produção em contraposição ao desperdício, tem sido cada vez mais amparada com iniciativas sustentáveis de um manejo mais correto dessas porções descartadas na cadeia produtiva de frutas. A indústria de processamento de frutas tem revisto o conceito de produção e adotado um sistema mais seguro de produção associado à menor emissão de subprodutos ou, melhor ainda, no desenvolvimento de novos processos para utilizar essas porções descartadas em alimentos funcionais inovadores (ESPARZA et al., 2020).

Pautadas na necessidade aumento de consumo de frutas, legumes e vegetais como parte da alimentação saudável, essas iniciativas do uso dessas matrizes normalmente descartadas se fortalecem com o estudo de seus constituintes nutricionais propriamente ditos. Essas matrizes, denominadas genericamente de resíduos, bagaços, subprodutos, ou mesmo, de coprodutos, podem ser aliadas à alimentação saudável. Estudos que caracterizaram subprodutos de caju quanto ao seu potencial tecnológico de aplicação em novos alimentos, assim como quanto aos seus aspectos nutricionais e biotativos de constituintes fenólicos e fibras alimentares podem ser encontrados (MEDEIROS et al., 2019; SABINO et al., 2020).

O caju, *Anacardium occidentale*, é um fruto não-climatérico tradicionalmente endêmico das regiões nordeste do Brasil. Formado pelo fruto verdadeiro (castanha) e pseudofruto (parte pulposa, ou maçã) ele é usado na alimentação local e na produção de doces, sucos e, principalmente, castanha seca e/ou torrada. Justamente por ser a parte economicamente mais rentável, o favorecimento do processamento da castanha gera grande desperdício do pseudofruto, descartado, tanto pela sua maior perecibilidade quanto pela sua utilização para extração do suco, que gera uma matriz fibrosa pós-prensagem sem destinação específica (SIQUEIRA; BRITO, 2003; BERRY; SARGENT, 2011). Ações para o aproveitamento dessa matriz na alimentação humana têm sido elencadas de forma preliminar por órgão nacionais e necessitam de maior aprofundamento (SIQUEIRA; BRITO, 2003; LIMA et al., 2014).

Nessa perspectiva, os subprodutos das frutas tropicais como o caju podem ser considerados fontes potenciais de fibras dietéticas e pigmentos naturais, corroborando com as recomendações internacionais para aumento do consumo de fibras (KOWALSKA et al., 2017; BUSSOLO DE SOUZA et al., 2018; MEDEIROS et al., 2019). Um número crescente de estudos aprofundados abordou as vias metabólicas envolvidas na liberação de compostos antioxidantes bioativos de subprodutos ao longo da passagem pelo trato gastrointestinal humano (TOURIÑO et al., 2011; FARAG et al., 2020). Compostos na casca, sementes e polpa residual de frutas podem ser fontes de energia para a microbiota intestinal, gerando vários metabólitos bioativos com biodisponibilidade e ou bioatividade aprimorada (ZHANG; JU; ZUO, 2018).

Vale ressaltar que estudos com foco no subproduto de caju associados a essa temática da microbiota intestinal ainda são limitados. Nossas investigações nos levaram a apenas dois estudos do potencial modulador do subproduto de caju na microbiota intestinal com associação de desfechos de saudabilidade: um realizado em modelo animal de síndrome metabólica e outro com uma simulação *in vitro* da microbiota intestinal humana (BATISTA et al., 2018; MENEZES et al., 2021). Em contrapartida, mais estudos foram elencados quando associam

probióticos com o subproduto fibroso ou suco do caju no desenvolvimento de novos alimentos (PEREIRA; MACIEL; RODRIGUES, 2011; DUARTE et al., 2017; KAPRASOB et al., 2018). Esses resultados só confirmam a relevância do presente estudo de utilizar o substrato fibroso de subproduto de caju no desenvolvimento de alimentos inovadores, como leites fermentados, assim como avaliar a sua relação com a microbiota intestinal.

1.4 Compreensão e investigação da microbiota intestinal associado ao uso de subprodutos de fruta.

O intestino humano compreende um habitat natural para uma população grande, diversa, dinâmica e ativa de microrganismos, principalmente bactérias anaeróbias, que se adaptaram à vida nas superfícies da mucosa no lúmen intestinal, vivendo em uma relação simbiótica (DUEÑAS et al. 2015; LI et al. 2016). A microbiota intestinal tem muitas funções importantes, como síntese, digestão e absorção de nutrientes, modulação imunológica, controle de patógenos, modulação da extração de energia de alimentos e regulação do apetite (TURNBAUGH et al. 2006; RUSSELL et al. 2011; PERRY et al. 2016; SCHNORR et al. 2016; WANG et al. 2017).

Por outro lado, condições que gerem desequilíbrio da microbiota intestinal (disbiose) aumentam o risco de desenvolver muitas doenças, como doenças hepáticas (GOEL et al. 2014), distúrbios metabólicos associados a condições gastrointestinais (PERRY et al. 2016; PARKER et al., 2017), doenças respiratórias (BROWN et al. 2017), condições psicológicas e autoimunes (MACPHERSON; HARRIS, 2004; THAKUR et al., 2014; BUTTÓ; HALLER, 2016).

A microbiota intestinal é dinâmica, aumentando de uma pequena diversidade e número de microrganismos no estômago para uma variabilidade considerável e números elevados no cólon, que podem chegar a 10^{12} UFC / mL (DUEÑAS et al. 2015). Devido aos avanços na biologia molecular, a subdivisão da microbiota intestinal humana em diferentes enterótipos vem sendo proposta por vários grupos de pesquisa, indicando a existência de espécies microbianas que se proliferam em simbiose e que podem responder de forma diferente à dieta, ingestão de drogas e outros hábitos de vida (ARUMUGAM et al., 2011; WU et al., 2011). A composição desses enterótipos afeta a passagem de nutrientes pela mucosa intestinal, impedindo a entrada de grandes partículas de alimentos, bactérias potencialmente patogênicas, leveduras e parasitas (CONLON; BIRD, 2015). Os padrões alimentares podem ser responsáveis por até 57% das alterações da microbiota intestinal, levando a situação de disbiose, em que a junções especializadas são afetadas negativamente, fazendo com que os alimentos não digeridos,

compostos microbianos e outros corpos estranhos perpassem a mucosa intestinal em um processo denominado endotoxicemia (CLARK; MACH, 2016).

Considerando o exposto, a preocupação na busca por metodologias para o estudo dos enterotipos e da microbiota intestinal tem repercutido cada vez mais em técnicas e modelos sofisticados e padronizados para simulação da digestão e fermentação colônica. Esses modelos são uma primeira opção antes do uso de modelos animais ou humanos. Estes apresentam limitações no acesso ao conteúdo intestinal e na categorização mais precisa dos efeitos que medicamentos, nutrientes ou ingredientes podem ter na complexidade interindividual da microbiota intestinal (SOUZA et al., 2008).

Os modelos de digestão simulada *in vitro* objetivam garantir resultados mais padronizados e reproduzíveis, possibilitar uma melhor dinâmica de coleta de amostras com menos restrições éticas e fazer mais inferências em diferentes estágios da fermentação colônica (VENEMA; ABEELE, 2013). A representatividade desses modelos na manutenção de um microbioma intestinal semelhante ao humano foi avaliada e validada em estudos com o uso de ferramentas moleculares altamente específicas (ABEELE et al., 2010). No entanto, na maioria dos casos, as abordagens *in vitro* desenvolvem hipóteses que precisam ser comprovadas em ensaios clínicos em humanos (VENEMA; ABEELE, 2013).

Os modelos usados para a simulação do microbioma são consideravelmente diversos, variando desde incubações de curto prazo com tubos de ensaio isolados ou reatores com culturas microbianas de animais ou humanos, até sistemas complexos de reatores de estágio único, passando por sistemas sem contínuos ou contínuos com vários compartimentos subsequentes (VENEMA; ABEELE, 2013).

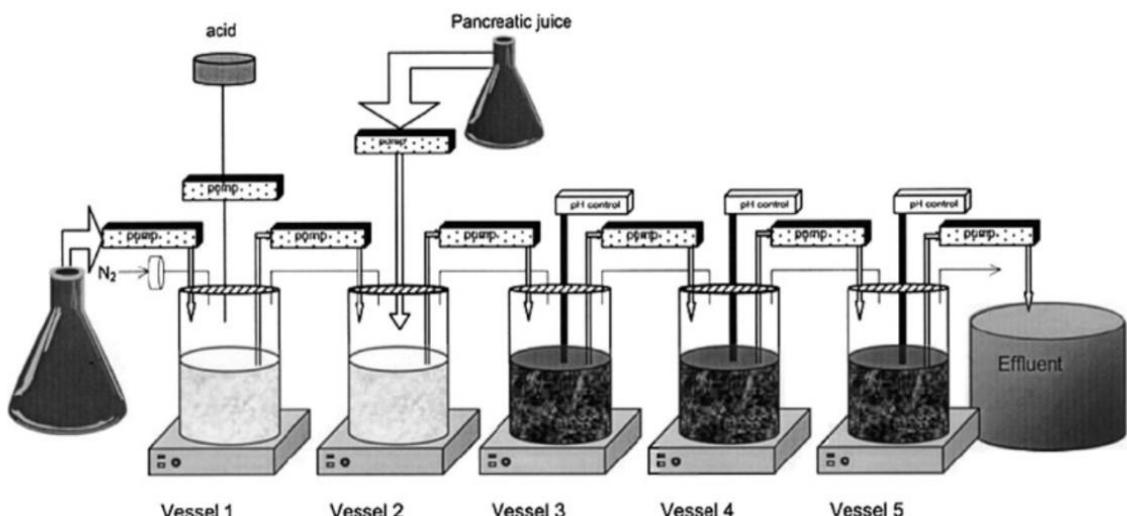
O Simulador do Ecossistema Microbiano Humano - SEMH® é um dos sistemas mais modernos, dinâmicos e automatizados. A Figura 1 ilustra a subdivisão de seus cinco reatores conectados que representam o estômago, o duodeno e o cólon ascendente, transverso e descendente (MOLLY et al., 1994; POSSEMEIRS et al., 2004). O SEMH® é amplamente divulgado em diversos estudos devido as suas condições biológicas controladas (pH, tempo de retenção, inoculação e temperatura) para simular aquelas encontradas *in vivo* (SIVIERI et al., 2014; DUQUE et al., 2016; FREIRE et al., 2017; BIANCHI et al., 2018; BIANCHI et al., 2019; NEVES CASAROTI et al., 2020).

A pesquisa no SEMH® com alimentos probióticos adicionados com extratos naturais, fibras alimentares, sucos de frutas e outras bebidas vegetais prebióticas, probióticas ou simbióticas tem demonstrado resultados positivos em alguns desfechos como: aumento de espécies bacterianas benéficas , na redução da abundância de microrganismos relacionados à

disbiose, aumento da atividade antioxidante, formação de ácidos graxos de cadeia curta e investigação da ação da microbiota na formação de metabólitos fenólicos ativos (KEMPERMAN et al., 2013; GARCÍA-VILLALBA et al., 2017; BIANCHI et al., 2018). Esses dados são, o que permite e incentiva sua aplicabilidade para novos estudos na ciência dos alimentos.

As pesquisas pregressas são importantes indicadores da eficácia desses modelos de digestão simulada. Isso permite e estimula cada vez mais o surgimento de novas pesquisas na temática da microbiota intestinal e alimentos funcionais com uso de subprodutos de frutas. Assim o uso de simuladores de microbioma intestinal humano representam uma oportunidade de aprofundar lacunas de informação, levando à descoberta de novas informações que atendam às demandas de alimentos funcionais e sustentáveis (COMAN et al., 2020; BUSSOLO DE SOUZA et al., 2019).

Figura 1: Representação do Simulador do Ecossistema Microbiano Humano (SEMH®).



Fonte: SIVIERI et al., 2014. Vessel 1: reator estomacal; Vessel 2: reator do duodeno; Vessel 3, 4 e 5: reatores do colôn ascenden te, transversal e descendente.

1.5 Fitoquímicos de subprodutos de frutas e sua relação com a microbiota intestinal e atividade antioxidante.

A diversidade fotoquímica dos subprodutos de fruta abrange desde compostos estruturais como fibras solúveis e insolúveis até compostos bioativos como carotenoides e compostos fenólicos. Desses, mais de 8.000 espécies fenólicas são conhecidas, compreendendo flavonoides e não flavonoides (BALASUNDRAM; SUNDRAM; SUMMAN, 2009;

BARBIERI et al. 2017). O primeiro grupo é responsável por quase dois terços dos fenóis da dieta e apresentam uma estrutura constituída de anéis aromáticos conjugados com um grau diverso de hidroxilação, metoxilação e glicosilação (ROBBINS et al., 2003; SHAHIDI; NACZK, 2004; YAO et al., 2004; SHAHIDI; AMBIGAIPALAN, 2015).

Compostos fenólicos podem se combinar com as fibras estruturais dos tecidos vegetais para formar um complexo definido como “concentrado de fibra dietética contendo quantidades significativas de antioxidantes naturais associados a compostos não digeríveis” (QUIRÓS-SAUCEDA et al., 2014; Beres et al., 2016). Uma vez que esse complexo praticamente não afetado pelas enzimas digestivas humanas, ele pode ser metabolizado pela microbiota intestinal contribuindo para a sua modulação ao diminuir a disbiose e melhorar a saúde humana em um ambiente antioxidant (TOMÁS-BARBERÁN et al., 2016; VELDERRAIN-RODRÍGUEZ et al., 2016).

Os subprodutos da fruta podem conter vários compostos fenólicos, incluindo os do tipo flavonóide (catequina, queracetina, dímeros de procianidina e proantocianidinas) e os do tipo não flavonóide (ácidos fenólicos, estilbenos, taninos, cumarinas, etc.) (GÓMEZ-GARCÍA et al., 2020; SHAHIDI, AMBIGAIPALAN 2015; DIAZ-GEREVINI et al. 2016; GIL-SÁNCHEZ et al. 2017). A principal hipótese com relação aos subprodutos de frutas como ingredientes ou alimentos funcionais está na presença desses compostos fenólicos e sua relação bidirecional com a microbiota intestinal. Assim, a fermentação seletiva desses compostos no intestino produz metabólitos derivados de polifenóis e esses teriam a capacidade de remodelar a microbiota intestinal na garantia de benefícios à saúde do hospedeiro (FRAGA et al., 2019).

Essa hipótese se sustenta pelo fato de que existe uma relação dinâmica entre os constituintes dos alimentos e a homeostase intestinal. É obrigatório saber que os compostos bioativos da dieta devem atingir o tecido alvo em concentrações biologicamente ativas (GÍL-SANCHÉZ et al., 2018). Para tanto, esses compostos devem ser inicialmente liberados da matriz alimentar e transformados em uma fração potencialmente disponível para absorção intestinal (CARBONELL-CAPELLA et al., 2014). Nessa questão, a microbiota intestinal contém um grande aparato genético para realizar reações bioquímicas na fisiologia do hospedeiro, incluindo degradação de substâncias xenobióticas, biossíntese de vitaminas e catabolismo de fibras e de polifenóis (BUTTÓ; HALLER, 2016).

A matriz de subprodutos da fruta, formada predominantemente por celulose e hemicelulose, contém compostos fenólicos covalentemente ligados (ácido ferúlico, ácido gálico, ácidos clorogênicos, procianidinas, catequina) que podem ser liberados e sofrer biotransformação por parte da microbiota intestinal (JAKOBEC; MATIĆ, 2019). Foi estimado

que 90-95% dos polifenóis dietéticos não são absorvidos no intestino delgado e chegam ao cólon praticamente intactos, onde podem sofrer metabolismo pela microbiota intestinal (GIBSON et al. 2017). Estudos em animais, humanos e em sistema de simulação dinâmica do cólon demonstraram a capacidade da microbiota intestinal em transformar diferentes oligômeros e polímeros de flavonóides de subprodutos de frutas em metabólitos fenólicos derivados (CAMPOS et al., 2020; SÁYAGO-AYERDI; ZAMORA-GASGA; VENEMA, 2020; GIL-SÁNCHEZ et al., 2018a; GIL-SÁNCHEZ et al., 2018b; TOURIÑO et al., 2011).

Considerando a exemplo os flavonoides como os principais advindos da dieta, sua digestão começa já no ambiente bucal. Glicosídeos monômeros sofrem uma fraca ação da β -glicosidase salivar e somente nas primeiras porções do intestino delgado ocorre maior desglicosilação pela lactase-florizina hidrolase (LPH) nas células de borda-em-escova (RUBERT et al., 2020; SCALBERT et al., 2005). Alguns dos flavonóides desglicosilados são absorvidos nas células epiteliais por difusão passiva e alcançam o fígado, sofrendo metabolização de fase II de conjugação (sulfatação ou glucuronidação) para, em seguida, serem liberados na circulação sanguínea (RUBERT et al., 2020).

Parte desses metabólitos retorna ao lúmen intestinal via circulação entero-hepática e, juntamente com as porções não absorvidas (assim como os flavonóides poliméricos e oligoméricos), seguem até o intestino grosso, onde sofrem intensa ação fermentativa pela microbiota (RUBERT et al., 2020; DUEÑAS et al. 2015). No cólon, esses compostos são metabolizados por diversas ações enzimáticas, como na clivagem de interflavana (quebra de oligômeros e polímeros), quebra das estruturas do anel de fenol, desidroxilação, desmetilação e descarboxilação (MONAGAS et al. 2010).

Estudos têm discutido que a ação da microbiota intestinal nos flavonoides de subprodutos de frutas resulta na biotransformação de flavan-3-óis, taninos hidrolisáveis e proantocianidinas. Esses novos metabólitos biotransformados podem atingir diferentes sistemas metabólicos do organismo humano através da circulação sanguínea ao serem detectados no plasma, urina e tecidos humanos (SAURA-CALIXTO et al., 2010; SÁNCHEZ-PATÁN et al., 2015; WANG et al., 2015; SASOT et al., 2017). Além disso, esses novos metabólitos também podem apresentar um amplo efeito no organismo do hospedeiro após serem absorvidos e conjugados no fígado e liberados na circulação sanguínea, visando diferentes tecidos-alvo (GASPEROTTI et al., 2015; ÉSPIN; GONZÁLES-SARRÍAS; TOMÁS-BARBERAN, 2017; TOMÁS-BARBÉRAN; SELMA, ÉSPIN, 2018; WILLIAMSON; CROZIER, 2018).

A atuação de polifenóis e fibras presentes em subprodutos de frutas na modulação da microbiota intestinal também pode estar relacionada aos seus efeitos sobre marcadores

inflamatórios. Morais et al. (2016) relataram que as antocianinas podem ter potencial bifidogênico, o que pode resultar na melhora da atividade da barreira intestinal e na redução da translocação de LPS para a circulação. Um estudo *in vitro* com amostras fecais humanas utilizando subprodutos do caule e da casca do abacaxi mostrou a capacidade desse subproduto em promover a multiplicação de *Bifidobacterium* spp. e *Lactobacillus* spp. Também foram detectadas mudanças no perfil dos compostos fenólicos, com uma alta liberação de derivados dos ácidos hidroxicinâmicos (CAMPOS et al., 2020).

Campanella et al. (2017) mostraram que os subprodutos da uva podem ser substratos funcionais para bactérias benéficas autóctones, repercutindo em multiplicação de bifidobacterias e no incremento das defesas antioxidantes inatas. Foi observada uma baixa expressão do gene pró-oxidante SOD-2 induzida por todas as preparações fermentadas de subprodutos de uva. Corrêa et al. (2017), em uma fermentação *in vitro* de subprodutos da uva Merlot, observaram efeitos antimicrobianos contra *Enterococcus faecalis* e *Listeria monocytogenes* (espécies patogênicas relacionadas à disbiose intestinal). Além disso, Pozuelo et al. (2012) relataram que os extratos de uva têm um estímulo no conteúdo total de lactobacilos no conteúdo cecal de ratos, principalmente de *Limosilactobacillus reuteri* e *Lactobacillus acidophilus* em ensaios *in vitro*.

Por outro lado, são poucos os estudos relatados quanto a modulação de microbiota intestinal com uso de caju, seja seu suco ou seu resíduo. Menezes et al. (2020) incorporaram subproduto puro de caju em sistema de digestão e fermentação colônica e observaram aumento das contagens de bactérias lácticas totais e de ácidos graxos de cadeia curta, assim como diminuição do pH e contagens de Enterobacteriaceae após 24h de fermentação. Batista et al. (2018) aplicaram o mesmo subproduto de caju concomitante à dieta hiperlipídica de ratos com síndrome metabólica e atestaram melhora no perfil lipídico e uma maior acidificação do conteúdo fecal, provavelmente associado a contagem de *Lactobacillus* spp. e formação de ácido láctico.

É possível que o metabolismo e a absorção dos polifenóis sejam determinados principalmente por suas características físico-químicas. Monômeros e alguns dímeros são absorvidos diretamente no intestino delgado, enquanto os oligômeros e polímeros precisam ser transformados em seus metabólitos fenólicos derivados da ação microbiana no intestino grosso para posterior absorção. Como a maior parte dos polifenóis é altamente polimerizada ou covalentemente ligada à fibra alimentar, a ação da microbiota intestinal desempenha um papel essencial na biodisponibilidade e bioatividade. Experimentos usando simuladores dinâmicos de cólon mostraram que diferentes ácidos benzoicos, fenólicos, ácidos fenilacéticos, ácidos

fenilpropiônicos, valerolactona, ácidos valéricos e ácidos cinâmicos foram os principais metabólitos fenólicos bioacessíveis liberados por extratos de subprodutos de uva (GIL-SANCHÉZ et al., 2018a).

Associado à degradação de compostos fenólicos, a fibra alimentar presente nos subprodutos da fruta pode ser fermentada pela microbiota intestinal para produzir AGCC, como propionato, butirato e acetato, que podem ser usados como fonte de energia pelo epitélio intestinal, modulando bactérias benéficas ou mesmo atuando como barreira contra a proliferação de espécies patogênicas, devido à acidificação do meio (BUSSOLO DE SOUZA et al., 2019; CONLON; BIRD, 2015).

A capacidade de modulação seletiva da microbiota do cólon associada ao consumo de fibras de subprodutos de frutas foi investigada em diferentes estudos e correlacionada com a produção de AGCC. Conlon e Bird (2015) usaram um modelo de fermentação colônica dinâmica e verificaram que subprodutos de maracujá e laranja aumentarem a concentração dos AGCC propionato e acetato e modularem seletivamente os gêneros *Ruminococcus*, *Lachnospira*, *Bacteroides*, *Dialister* e *Roseburia*. Da mesma forma, um estudo *in vitro* subproduto de manga em modelo de fermentação colônica TIM-2 inferiu altos valores de acetato, butirato e propionato, bem como um aumento na abundância relativa de gêneros *Bifidobacterium*, *Lactobacillus*, *Dorea* e *Lactococcus* (SÁYAGO-AYERDI; ZAMORA-GASGA; VENEMA, 2019).

Outro foco de estudo quanto aos constituintes fitoquímicos de subprodutos de frutas está na compreensão que uma alimentação saudável pode predispor compostos antioxidantes, como os próprios flavonóides complexados na polpa, casca e semente de frutas. Como dito anteriormente esses compostos são parcialmente absorvidos, permanecem no lúmen intestinal por mais tempo e são metabolizados pela microbiota intestinal. Nesse contexto, flavonoides liberados da matriz vegetal, assim como seus metabólitos podem desempenhar um papel importante na modulação do estresse oxidativo pós-prandial (SIES; STAHL; SEVANIAN, 2005).

Os flavonoides e seus metabólitos fermentados pela microbiota podem atuar como antioxidantes diretos ao eliminarem radicais livres, compostos doadores de hidrogênio, inibidores de oxigênio singlete e quelantes de íons metálicos. Também podem atuar como antioxidantes indiretos, inibindo a atividade de enzimas pró-oxidantes, aumentando as moléculas antioxidantes endógenas e induzindo enzimas antioxidantes protetoras (TERRA et al., 2017).

A visão dos subprodutos mais aprofundada na sua constituição química permite rever alguns conceitos. Por muitos anos, as fibras alimentares foram estudadas por seu impacto no trato gastrointestinal humano devido às suas propriedades prebióticas que melhoram a multiplicação de microrganismos benéficos. No entanto atualmente os estudos também investigaram o efeito biológico desses compostos, tanto *in vitro* quanto *in vivo* (DA SILVA et al., 2013; MOLDOVAN et al., 2016; ALBUQUERQUE et al., 2019a). Danos oxidativos e processos inflamatórios intracelulares ou intersticiais têm sido correlacionados a diversas disfunções de saúde. O uso de compostos naturais (purificados ou em conjunto com muitos outros componentes bioativos) com propriedades antioxidantes e anti-inflamatórias surgem como alternativas aos fármacos no auxílio à redução de risco de diferentes tipos de doenças crônicas.

1.6 Subprodutos da fruta e sua potencialidade prebiótica aliado à probióticos

Além da capacidade de modulação da microbiota intestinal, o uso de subprodutos de frutas como potenciais ingredientes prebióticos com utilização seletiva por microrganismos benéficos alóctones tem sido investigada (ALBUQUERQUE et al., 2016; VIEIRA et al., 2017). Como denotado anteriormente até 2017, a definição de prebióticos estava mais intimamente ligada apenas ao efeito benéfico promovido pelas fibras alimentares, que inclui ingredientes como frutoligossacrídeos e inulina. Esses ingredientes prebióticos são conhecidos por sua capacidade de estimular a multiplicação de microrganismos benéficos, como os pertencentes ao grupo das bactérias ácido lácticas (*Lactobacillus* spp, *Lactococcus* spp., *Streptococcus thermophilus*, entre outros) e gênero *Bifidobacterium*. Sabe-se também que parte desses microrganismos são comumente usados na formulação de alimentos e ou suplementos probióticos.

Como o conceito mais atual de prebióticos abrange outros substratos desde de que sejam utilizados seletivamente pelos microrganismos do hospedeiro, ou no caso de simbióticos seletivamente utilizados pelo microrganismo administrado em conjunto. Isso, por sua vez, incorpora os fitoquímicos presentes nos subprodutos como potenciais responsáveis pela melhoria na multiplicação e a atividade de microrganismos benéficos (ALBUQUERQUE et al., 2019a; ALBUQUERQUE et al., 2019b). Nesse sentido, subprodutos de frutas ou compostos de alto valor agregado extraídos de frutas poderiam ser explorados como prebióticos, e associado com probióticos em formulações de simbióticos sinérgicos.

Fibras alimentares e compostos fenólicos são componentes das frutas que contribuem para a melhoria da saúde humana em virtude de sua atividade anti-inflamatória e seu potencial antioxidante (ALBUQUERQUE et al., 2019a) Efeitos positivos na microbiota intestinal

também já foram atestados pelo estímulo à multiplicação e a atividade de microrganismos benéficos (ALBUQUERQUE et al., 2016; ALBUQUERQUE et al., 2017; BUSSOLO DE SOUZA et al., 2019). O impacto desses compostos bioativos de subprodutos de frutas tem sido amplamente estudado, especialmente o seu efeito sobre a obesidade, doenças inflamatórias intestinais, síndrome metabólica e outras doenças (HUL et al., 2018; COMAN et al., 2019; BIANCHI e SIVIERI, 2020). Considerando os benefícios à saúde de alguns compostos bioativos presentes em resíduos de frutas, pesquisadores têm investigado seu potencial prebiótico usando modelos *in vitro* e *in vivo* (QUIRÓS-SAUCEDA et al., 2018).

Considerando-se que os subprodutos das frutas apresentam constituintes ácidos e podem conter diversos componentes antimicrobianos, esses substratos poderiam impactar negativamente na multiplicação e na viabilidade de algumas culturas *starter* e probióticas (ESPÍRITO SANTO et al., 2012). Por outro lado, a riqueza nutricional dos subprodutos de fruta pode contribuir para estimular a multiplicação de microrganismos benéficos alóctones e comensais da microbiota intestinal humana. Albuquerque et al. (2017) observaram que os subprodutos do maracujá estimularam a multiplicação de *Lactobacillus reuteri* RC-14 e *Lactobacillus acidophilus* LA-5 após 24 horas de fermentação em bebida vegetal de soja.

Outros estudos também investigaram o impacto de subprodutos de frutas na multiplicação de culturas *starter* e probióticas. Subprodutos da laranja (*Citrus sinensis*), maracujá (*Passiflora edulis* f. *Flavicarpa*), acerola (*Malpighia emarginata*) e manga (*Mangifera indica*) estimularam a multiplicação das cepas de *Streptococcus thermophilus*, *Lactobacillus* spp. e *Bifidobacterium* spp. No entanto, com exceção da acerola, esses subprodutos da fruta também estimularam a multiplicação de *Clostridium perfringens* e *Escherichia coli* (VIEIRA et al., 2017; VIEIRA et al., 2019).

As uvas (*Vitis vinifera*) são conhecidas por seu valor nutricional e funcional, voltado ao perfil de compostos bioativos, principalmente fenólicos, como ácidos fenólicos, flavonóides e taninos, responsáveis pelo expressivo efeito antioxidante (BERES et al., 2017). Em um estudo com uma bebida fermentada, a multiplicação de *Lactobacillus* spp. foi estimulada quando o subproduto da uva foi adicionado, em comparação com a bebida não suplementada. Os lactobacilos permaneceram viáveis durante o período de armazenamento e apresentaram efeito bacteriostático contra *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar *enteritidis*, *Listeria monocytogenes* e *Escherichia coli* (DIAS et al., 2019).

Os subprodutos da fruta em alimentos fermentados podem melhorar a taxa de acidificação. Casarotti et al. (2018) mostraram que os subprodutos da laranja e do maracujá diminuem o tempo de fermentação das bebidas de arroz. No entanto, Albuquerque et al. (2019b) relataram

que os subprodutos do maracujá e/ou frutoligossacrídeos não alteraram o tempo de fermentação dos produtos de soja. Este é um assunto importante, pois grandes períodos de fermentação tornam o processo caro para a indústria, o que é negativo do ponto de vista econômico.

Estudos que focam no caju normalmente se referem a seu suco como um subproduto funcional e fermentável para cepas probióticas. Kaprasob et al. (2018) atestaram aumento de vitaminas do complexo B e frutoligossacarídeos em suco de caju fermentado por *Lactobacillus casei* e *Lactobacillus acidophilus*, apesar da diminuição de contagem das cepas em até 48 horas. Por outro lado, Pereira et al. (2011) já haviam otimizado as condições de fermentação e conseguiram manter valores viáveis e acima de 8,00 log UFC/mL de culturas de *Lactobacillus casei* NRRL B-442 em suco de caju fermentado por até 42 dias. Essas iniciativas combinadas demonstram ainda uma preferência às pesquisas com o suco do caju, o que por sua vez ainda gera porções de subprodutos que podem ser incorporados em novos estudos.

Uma abordagem mais contextualizada do uso de subprodutos de fruta em alimentos, probióticos ou não, representam novos padrões alimentares que podem causar mudanças na microbiota intestinal humana (BUTTÓ; HALLER, 2016). Como observado nos estudos, um cenário otimista vem surgindo para a criação de novos produtos alimentícios usando matrizes de subprodutos de frutas refinados ou moléculas bioativas extraídas para atingir propriedades funcionais correlacionadas aos probióticos e microbiota intestinal (PÉREZ-BURILLO et al., 2019; RICO et al. al., 2020). No entanto, mais estudos *in vivo*, principalmente ensaios clínicos, ainda são necessários para validar essas suposições e provar um potencial prebiótico ou simbiótico desses subprodutos.

Como é possível denotar na trajetória de informações passada até então, a composição química notavelmente diversa dos subprodutos das frutas e, dentre elas, o pseudofruto do caju, representa um grande nicho para a investigação dos compostos bioativos. Embora a produção desses compostos em alta escala ainda requeira tempo para otimização, algumas evidências têm surgido com resultados substanciais e otimistas. Assim, o conteúdo nutricional, bem como os efeitos funcionais e biológicos dos subprodutos do pseudofruto do caju podem e devem ser amplamente explorados quanto à sua eficácia em melhorar a multiplicação e a atividade de microrganismos probióticos. E isso, por sua vez se associa ao desenvolvimento de novos alimentos alinhados às preocupações com a função de uma microbiota intestinal saudável.

2. OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

- Avaliar aspectos funcionais do subproduto do caju isolado e após aplicação em leite fermentado com uma cepa probiótica e uma cultura *starter* e em modelos *in vitro* estático e dinâmico, simulando a passagem do alimento pelo trato gastrintestinal humano.

2.2 OBJETIVOS EPECÍFICOS

- Caracterizar o subproduto do caju desidratado (SC) em relação aos seus compostos fenólicos e atividade antioxidante;
- Selecionar um probiótico e uma bactéria *starter* para aplicação no leite fermentado, com base em sua capacidade de fermentar e se multiplicar na presença de SC;
- Caracterizar padrões de identidade e qualidade do SC e do leite fermentado com e sem SC;
- Determinar a viabilidade de bactérias probióticas e *starter*, compostos bioativos e atividade antioxidante, durante o armazenamento refrigerado do leite fermentado com SC;
- Determinar a sobrevivência às condições gastrointestinais das bactérias probióticas presentes no leite fermentado com e sem SC;
- Avaliar a capacidade de modulação microbiana do leite fermentado com ou sem SC em um Simulador do Ecossistema Microbiano Humano (SEMH®).

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Matriz vegetal desidratada

O subproduto do caju foi obtido por doação de uma indústria de polpa de frutas congelada “*Delícia da Fruta*”, localizada em Natal, no Rio Grande do Norte. Cinco porções de bagaço de caju pós-prensagem de aproximadamente 3kg foram separados em sacos plásticos estéreis e armazenados em refrigeração (5°C) ainda na indústria.

A coleta foi realizada uma única vez e as porções foram transportadas em contêiner com isolamento térmico e gelo de água filtrada até laboratório de tecnologia de alimentos do departamento de Engenharia de Alimentos da Universidade Federal do Rio Grande do Norte (UFRN). Todas as porções foram misturadas manualmente em um único lote utilizando vasilhames esterilizados, em ambiente climatizado (20°C). Porções desse lote foram subdivididas em sacos plásticos estéreis com fechamento hermético com 500 g cada. O congelamento foi realizado em freezer horizontal (Eletrolux, Brasil) à -22°C por 24 horas e com disposição das amostras de forma a facilitar a troca de calor e congelamento homogêneo (separados entre si e sem empilhamento). Essas porções foram mantidas em congelamento até o transporte para a Universidade de São Paulo (USP).

Para transporte as amostras foram retiradas do congelamento e armazenadas em contêiner de isopor revestidos com papel alumínio e selados com *silvertape* não mais que 2 horas antes do transporte interestadual. Após chegada em São Paulo, as amostras foram diretamente encaminhadas para descongelamento a $4 \pm 2^{\circ}\text{C}$ por mais 24 horas em refrigerador vertical (Eletrolux, Brasil) na Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Departamento de Tecnologia Bioquímico Farmacêutica.

Após total descongelamento as amostras foram submetidas à branqueamento para diminuir escurecimento enzimático durante desidratação. Para isso utilizou-se autoclave (Primatec, São Paulo, Brasil) com água a $98\text{-}99^{\circ}\text{C}$. As porções de 500g foram individualmente submersas na água fervente por 2 minutos e posteriormente resfriadas em banho de imersão de gelo de água filtrada. Em seguida as porções branqueadas foram manualmente espalhadas em bandejas de aço inox para serem desidratadas à 60°C em desidratador com convecção de ar quente (Solab, São Paulo, Brasil) até aproximadamente 24 horas, em que atingiu peso constante. O material obtido, Subproduto de Caju Seco, ou S.C, foi pulverizado em processador de alimentos (Thermomix, Vorweck, Alemanha) e tamisado para a padronização de partículas com diâmetro inferior a 0,42 mm. O material final seco foi armazenado em frascos de vidro protegidos da luz, vedados com fita encerada (Parafilm, American, Brasil) e armazenado a $-20 \pm 2^{\circ}\text{C}$ até o uso.

Vale salientar que todo processo de manipulação dos SC para coleta, congelamento, transporte, descongelamento, branqueamento, desidratação e posterior armazenamento foram realizados de acordo com boas práticas de manipulação, uso de EPIs e adequada higiene pessoal.

3.2 Caracterização físico-química do Subproduto de Caju

Foi realizada mensuração de pH com medidor Orion (Modelo *Three Stars*, Thermo Fisher Scientific, EUA) e eletrodo tipo penetração para alimentos sólidos e semissólidos, modelo 2AO4 GF (Analyser, São Paulo, Brasil). Para o SC a medição foi realizada em solução de 10 g em 100 mL de água destilada homogeneizada em BagMixer 400 (Inter Science, St. Nom, França) por 2 minutos (IAL, 2008).

A acidez foi quantificada, utilizando-se o método de titulação para expressão em equivalentes de ácido málico (IAL, 2008). Para isso, 5 g de SC foi homogeneizado com 100 mL de água destilada em BagMixer 400 (Inter Science, St. Nom, França) por 2 minutos. Em seguida a mistura foi submetida à titulação com solução de NaOH a 0,10 M até atingirem pH de 8,2 - 8,4 (aferido com medidor de pH Orion Modelo *Three Stars* - Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, EUA). Para as titulações o volume de solução titulada foi utilizado para calcular a acidez em equivalentes de ácido málico em 100g de amostra.

A composição centesimal do SC realizada pela determinação de umidade por secagem em estufa até peso constante a 105°C (925.09 - AOAC 2012) para SC O resíduo mineral fixo foi obtido após incineração em mufla a 550°C (930.30 - AOAC 2012), gorduras totais pelo método com solvente à frio (Bligh & Dyer, 1959), proteínas pelo método de Kjeldahl (990.03 - AOAC 2012). A fibra alimentar total (FDT) (985,29 - AOAC 2012) e a fibra alimentar insolúvel (FDI) (991,42 - AOAC 2012) foram determinadas pelo método enzimático. O conteúdo de carboidratos disponíveis das amostras foi calculado pela diferença com o somatório de umidade, cinzas, proteínas, lipídios e fibra alimentar.

3.3 Avaliação do perfil de ácidos graxos do Subproduto de Caju

O SC foi submetido à extração de lipídeos totais e detecção do perfil de ácidos graxos de acordo com Bligh & Dyer (1959), Iverson, Lang, Cooper (2001) e Shirai, Suzuki, Wada (2005).

Primeiramente, foi necessário fazer a extração de fração gordurosa com uso de solventes a frio. Uma porção de 1,0 g de S.C foi misturadas com clorofórmio, metanol e água destilada, usando as proporções de 1:1:2:0,8. As amostras em solução extratora foram agitadas em

agitador de tubos de bancada tipo vortex por 2 minutos. Foi adicionado volumes na mesma proporção de peso da amostra (1,0 mL) de clorofórmio e solução de NaCl a 0,88%, seguida de nova homogeneização em vortex de bancada (mod. AP56, *Phoenix Lufanco*, Brasil) e centrifugação por 15 minutos a 9000 rpm (centrífuga modelo 2-16PK, Sigma, Alemanha). A fração gordurosa de clorofórmio foi separada e submetida à secagem total em gás N₂. A quantidade final de fração gordurosa foi pesada, dissolvida em 1 mL n-Hexano e armazenada a -80°C até etapa de esterificação.

Para a esterificação dos ácidos graxos, 3,0 mg da fração lipídica previamente extraída foi adicionada em tubos de ensaio de 15 mL contendo: 50 µL de hexano com padrão interno C23:0 (tricosonoato de metila, Sigma-Aldrich) a 10 mg/mL, 50 µL de solução em metanol de BHT (hidroxitolueno butilado, Sigma-Aldrich) a 5 mg/ mL e 1 mL de NaOH 0,5M em metanol. Esses reagentes foram agitados por 15 segundos em vortex de bancada (mod. AP56, *Phoenix Lufanco*, Brasil) e submetidos a aquecimento em banho de água (100°C por 5 minutos). Seguiu-se de esfriamento para a adição de 2 mL de trifluoreto de boro metanólico a 14% (BF3-metanol, Sigma-Aldrich), agitação em vortex de bancada por 15 minutos e repetição do aquecimento por 5 minutos em banho de água fervente. As amostras foram, novamente, esfriadas para a adição de 1 mL de isooctano, com posterior agitação manual por 30 segundos e adição de 5 mL de solução saturada de NaCl e homogeneização suave por inversão do tubo. As amostras foram mantidas em repouso para separação de fases, em que 500 µL da fase superior (isoctano) foi pipetada, evaporada em gás N₂ e misturada a 500 µL de hexano.

Alíquotas 200 µL da solução de hexano contendo os ácidos graxos esterificados foram adicionadas em *vials* específicos para análise de Cromatografia Gasosa acoplada a Espectrometria de Massa (CG-EM, Agilent 7890^a GC, Santa Clara, CA, EUA). Uma coluna capilar, em sílica fundida (J&W DR-23 Agilent 122-236; 60 m por 250 mm de diâmetro interno) foi usada para separar os ácidos graxos, usando 1 µL de volume injetado. Hélio de alta pureza foi usado como gás carreador em uma taxa de fluxo de 1,3 mL/ min e *split injection* de 50 L. A temperatura do forno foi programada para aumentar de 80°C até 175°C em uma taxa de 5°C / minuto, seguido de taxa de 3°C / minuto até 230 °C, e manutenção da temperatura por 5 minutos. As temperaturas de entrada e transferência da CG foram, respectivamente, 250 e 280 °C. A CG-EM ocorreu, usando 70 eV EI de *scan acquisition* e registrada como TIC. Todos os espectros de massa foram captados acima de razão massa / carga (m/z) entre 40 – 500 e os ácidos graxos das amostras foram identificados na biblioteca de massas do *National Institute of Standards and Technology* (NIST; Gaithersburg, MD, EUA), através de comparação dos tempos de retenção com os de uma mistura padrão de metil-ésteres de ácidos graxos (FAME)

37 – Sigma-Aldrich). Os resultados finais foram expressos em porcentagem representativa (%) dos principais ácidos graxos, micrograma do respectivo ácido graxo/ g de lipídio extraído (ug/g) ou grama/ 100 gramas de lipídio extraído.

3.4 Extrações para composição bioativa de Subproduto de Caju

Foi utilizado 1,0 g de SC misturado com 20 mL de metanol 70% durante 60 minutos a 200 RPM em agitador magnético na temperatura ambiente (*Ethik Technologies*, Brasil). Seguiu-se de centrifugação refrigerada a 5°C durante 15 minutos a 9000 RPM (modelo 2-16PK, Sigma, Alemanha) e separação do sobrenadante. O resíduo retido foi incorporado a mais 15 mL de metanol 70%, disperso por 3 minutos a 10000 RPM em Ultra-Turrax T25 (IKA, Brasil) e submetido a nova centrifugação. Os dois sobrenadantes separados no processo foram combinados e o volume foi completado a 50 mL com água destilada. Essas extrações foram mantidas congeladas a -80°C para as análises seguintes.

3.5 Determinação de fenólicos totais e perfil de compostos fenólicos do Subproduto de Caju

A determinação dos fenólicos totais foi realizada em todas as extrações, com base no método colorimétrico previamente adaptado usando reagente Folin-Ciocalteu (Sigma-Aldrich, Brasil) (MAGALHÃES et al., 2010). Em placas de 96 poços, 50 µL das extrações foram adicionadas e misturadas com mais 50 µL de reagente Folin-Ciocalteu (diluído 5 vezes em água destilada). A placa foi mantida em câmara escura durante 5 minutos, seguida de adição de 100 µL de NaOH 0,35 M e leitura em leitor de microplacas tipo Synergy HTX Multi-Detection (BioTek 174 Instruments Inc., Winooski, VT, USA), usando 760 nm como comprimento de onda. Concomitante à reação com as amostras, uma curva padrão usando concentrações decrescentes de solução de ácido gálico em etanol (A.G. - 0,2 mg/ mL) foi criada para se estimar os valores de compostos fenólicos totais das amostras em equivalentes (EAG) / 100 g.

A extração metanólica do SC foi submetida à cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) para investigação do perfil fenólico. Primeiramente, foi realizada uma extração em fase sólida, utilizando colunas de poliamida CC 6 (1g / 6mL) (Macherey-Nagel GmbH and Co., Duren, Alemanha) condicionadas com metanol e água destilada. Dois eluatos (metanol e metanol-amônia) foram extraídos e completamente evaporados sob pressão reduzida a 40 °C, dissolvidos em metanol e filtrados através de uma membrana de filtro de 0,22 µm (politetrafluoroetileno – PTFE, Millipore).

A identificação dos compostos fenólicos foi realizada em CLAE de fase reversa (sistema Hewlett-Packard 1100) com amostrador automático e bomba quaternária acoplada a detector de arranjo de diodos. Foi usada uma coluna Prodigy 5 µm ODS com sílica de fase reversa (250 mm por 4,6 mm, Phenomenex Ltd.). Os solventes eluentes foram A (água/ tetra-hidrofuran / ácido trifluoroacético 98: 2: 01) e B (acetona). Os extratos foram monitorados a 270 nm e injetados em triplicata para cada eluado (metanol e metanol / amônia). Para identificação dos compostos fenólicos de interesse, a identificação do pico, os tempos de retenção e as características espectrais da matriz do diodo foram comparadas aos de padrões e espectros do banco de dados.

3.6 Potencial antioxidante em DPPH· (2,2-difenil-1-picrihydrazil) do Subproduto de Caju

As extrações foram submetidas à avaliação do potencial antioxidante pela metodologia adaptada por Medeiros et al., 2019. Neste ensaio, o radical cromógeno roxo DPPH é reduzido por compostos antioxidantes e/ ou redutores para a hidrazina amarelo pálido e essa alteração pode ser monitorada e quantificada, utilizando-se um espectrofotômetro em comprimento de onda de 515 nm a 528 nm (KARADAG et al., 2009).

Para o presente estudo, alíquotas de 50 µL da extração produzida foram dispostas em placas de 96 poços seguido de adição de 200 µL de solução de DPPH em metanol (40 µg/mL). Após período de repouso em câmara escura (30 minutos), foi realizada a leitura de absorbâncias a 515 nm em leitor de microplacas tipo Synergy HTX Multi-Detection (BioTek 174 Instruments Inc., Winooski, VT, USA). Os valores de absorbância das extrações foram comparados ao valor da solução de DPPH pura para expressão em porcentagem de inibição (%). Adicionalmente, as extrações foram submetidas a diluições seriadas para a expressão dos valores de IC₅₀ (mg / mL), conforme metodologia adaptada de Rufino et al. (2007). Esse indicador foi aferido para se encontrar a concentração de extração que conseguiria inibir 50% do DPPH em reação.

3.7 Fermentabilidade *in vitro* de bactérias probióticas e *starter* no Subproduto de Caju

O SC foi avaliado quanto à sua capacidade de interferir na multiplicação de uma série de bactérias, utilizando fermentabilidade *in vitro*, seguindo a metodologia descrita por Vieira et al (2017) e especificada a seguir (RYU et al., 2007a; WATSON et al., 2013; GARCÍA-CAYUELA et al., 2014). Para isso 10 cepas de probióticos e 3 *starters* foram selecionadas e suas condições de reativação e cultivo para contagem encontram-se na Tabela 1

As cepas referidas foram retiradas do congelamento a -80°C e descongeladas em refrigerador por 30 minutos. A reativação das culturas congeladas utilizou 200 µL em 5 mL de

caldo e condições de cultivo específicos (Tabela 1). Seguiu-se de diluição dessa reativação com mistura de 100 µL dela em 9,9 mL de solução salina estéril (0,85%) para reduzir a contagem para valores de 4-5 log UFC / mL. Alíquotas de 100 µL dessa diluição para cada microrganismo foram adicionadas a 5 mL de caldo MRS modificado - MRSm (RYU et al., 2007b; VIEIRA et al., 2017) suplementado com 1% de SC e incubados a 37 °C por até 48 horas.

Salienta-se que com o objetivo de restringir a interferência que outros microrganismos eventualmente presentes no SC pudessem ter nos resultados, as amostras utilizadas para o teste de fermentabilidade *in vitro* foram previamente submetidas à esterilização por irradiação (fonte radioativa Co₆₀) no Instituto de Pesquisa de Energia Nuclear (IPEN, São Paulo). O procedimento foi realizado em um Gammacell 220 (Energia Atômica do Canadá Ltd., Ottawa, Canadá) com atividade de 1287,6 Ci e dose de 25 kGy, a uma taxa de 1.089 kGy/h.

Uma vez incubados, os microrganismos em MRSm + 1% de SC tiveram a enumeração de colônias em ágar seletivo no inóculo inicial (0 h) e após 24 h e 48 h de incubação. As contagens foram realizadas em ágar seletivo, conforme descrito na Tabela 1, utilizando-se a técnica de *drop plate* com 10 µL das diluições seriadas em solução salina 0,85% estéril (HERIGSTAD; HAMILTON; HEERSINK, 2001). Testes de controle negativos foram realizados para saber a eficiência da esterilização do SC. Também foram avaliadas a capacidade fermentativa de todas as cepas em caldo MRSm puro (sem SC) para comparação. Os resultados finais foram expressados na variação da população de microrganismos (delta – Δ) entre os tempos de 0h e 24h (Δ24), 24h e 48h (Δ24-48) e 0h e 48h (Δ48). Com base nesses resultados de variação da população, associado com pesquisas científicas sobre as cepas testadas, foram selecionadas uma cepa probiótica e uma *starter* para serem utilizadas nas formulações de leite fermentado.

Tabela 1 – Microrganismos avaliados no presente estudo e suas condições de cultivo para cada cepa.

Cepa e código	Caldo	Ágar	Condição de incubação
<i>Streptococcus thermophilus</i> TH-4® ^a			
<i>Streptococcus. thermophilus</i> ST-M6® ^a	HJ ¹	M17 ²	37 °C Aerobiose
<i>Streptococcus thermophilus</i> TA-40® ^b			
<i>Lactobacillus acidophilus</i> LA-5® ^c	MRS ³	MRS maltose ⁴	37 °C Aerobiose
<i>Limosilactobacillus fermentum</i> PCC® ^c	MRS ³	MRS ⁵	37 °C Anaerobiose ⁷
<i>Limosilactobacillus reuteri</i> RC-14® ^c			
<i>Lacticaseibacillus. paracasei</i> subsp. <i>paracasei</i> L. CASEI 431® ^c	MRS ³	MRS acidificado ⁶	37 °C Anaerobiose ⁷
<i>Lacticaseibacillus. paracasei</i> subsp. <i>paracasei</i> F-19® ^c			
<i>Lacticaseibacillus. rhamnosus</i> GR-1® ^c	MRS ³	MRS acidificado ⁶	37 °C Aerobiose
<i>Lacticaseibacillus. rhamnosus</i> LGG® ^c			
<i>Bifidobacterium animalis</i> subsp. <i>lactis</i> BB-12® ^c			
<i>Bifidobacterium. longum</i> BB-46® ^c	MRS cisteína ⁸	LP-MRS ⁹	37 °C Anaerobiose ⁷
<i>Bifidobacterium longum</i> subsp. <i>infantis</i> BB-02® ^c			

a: Cultura *starter* (Chr. Hansen, Hørsholm, Denmark). b: Cultura *starter* (DuPont, Dangé, France). c: Cultura probiótica (Chr. Hansen). 1: Hogg-Jago Glicose (HJ) (BLOMQVIST; STEINMOEN; HAVARSTEIN, 2006). 2: Ágar M17 (Oxoid, Basignstoke, UK) (RICHTER; VEDAMUTHU, 2001). 3: Caldo De Man-Rogosa e Sharpe. 4: Ágar MRS modificado com maltose (IDF, 1995). 5: Ágar MRS (Oxoid). 6: Ágar MRS acidificado pH 5.4 (BURITI; CARDARELLI; SAAD, 2007). 7: Sistema de anaerobiose AnaeroGen™ (Oxoid). 8: Caldo MRS (Oxoid) suplementado com L-cisteína (0.05 g/L, Sigma-Aldrich, St. Louis, USA). 9: Ágar LP-MRS (VINDEROLA et al., 2000). Proposta da nova denominação taxonômica para gênero *Lactobacillus* foi adotada (ZHENG et al., 2020).

4. Preparação das formulações de leite fermentado e períodos de amostragem

O leite fermentado foi produzido em três lotes independentes, de acordo com as proporções especificadas na Tabela 2 e passo-a-passo esquematizado na Figura 2. Optou-se por usar base láctea com ingredientes sem lactose para trazer um diferencial ao produto quanto a possibilidade de ser consumido por pessoas com intolerância a esse carboidrato.

Para a formulação do leite fermentado, leite esterilizado semidesnatado sem lactose (Ninho®, Nestlé) foi utilizado como base do cálculo proporcional dos ingredientes. O leite foi aquecido sob agitação em processador de alimentos (Thermomix, Vorweck®, Alemanha) para a posterior adição do açúcar (União®, Brasil), leite em pó (Ninho®, Nestlé, sem lactose) e gelatina sem sabor (Royal®, Mondelez). Nesse ponto, SC não esterilizado foi adicionado apenas à Formulação Teste (FT), mas ambas as formulações (teste e controle sem SC) foram

pasteurizados por 5 minutos a 90 ° C. Essas bases de leite fermentado foram resfriadas em banho de gelo até 37°C. Seguiu-se da adição das culturas probiótica e *starter* mais adaptadas ao SC na fermentabilidade *in vitro* resultando em um inóculo pré-fermentação de no mínimo 8,0 log UFC / mL.

A mistura das formulações foi incubada a 37 ° C até atingir pH 5,5 e refrigerada a 4 ° C em pernoite. Sabe-se que acidificações num patamar próximo a um pH 5,0 já são suficientes para causar dissolução do fosfato de cálcio seguido de agregação coloidal característica da precipitação das caseínas do leite (ZHAO; CORREIDIG, 2020). Isso se associa também com a não existência de um valor padronizado para o fim da acidificação segundo as legislações brasileiras para leites fermentados. As recomendações de padrões de identidade e qualidade para esse alimento apenas configuram a necessidade de haver diminuição do pH e coagulação.

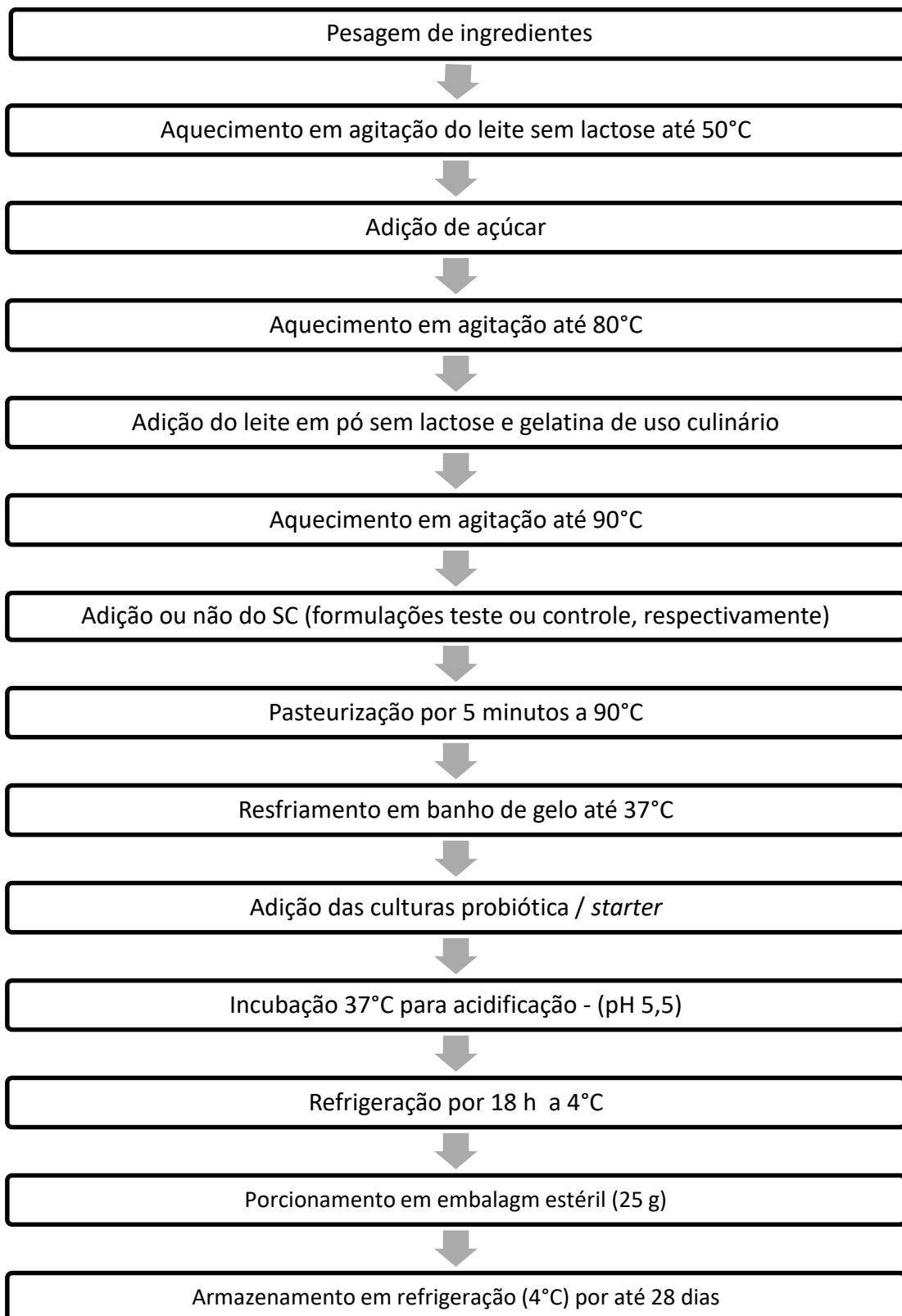
Após pernoite, os leites fermentados produzidos com adição ou não de SC foram homogeneizados com auxílio de espátulas higienizadas. Porções de 25 g foram subdivididas em copos de polipropileno (Tries Additivos Plásticos, São Paulo, Brasil), lacradas e armazenadas em refrigeração (4 ° C) por até 28 dias. Amostras foram usadas para investigação de parâmetros descritos a seguir a partir do primeiro dia após obtenção do produto e semanalmente nos dias 7, 14, 21 e 28 de armazenamento.

Tabela 2. Proporção de ingredientes usados na formulação dos leites fermentados.

Ingredientes (g/ 100 mL de leite semidesnatado sem lactose, Ninho®, Nestlé, Brasil)	Formulações	
	Teste (F.T)	Controle (F.C)
Subproduto de Caju desidratado (SC)	2,5	-
Leite em pó integral sem lactose (Ninho®, Nestlé, Brasil)	2,5	2,5
Sacarose (União®, Brasil)	5,0	5,0
Gelatina sem sabor (Modelez®, Brasil)	0,1	0,1

Fonte: próprio autor.

Figura 2 – Fluxograma de produção do leite fermentado com e sem adição de subproduto de caju desidratado.



Fonte: próprio autor.

4.1 Composição físico-química e centesimal dos leites fermentados

Foi realizada mensuração de pH com medidor Orion (Modelo *Three Stars*, Thermo Fisher Scientific, EUA) e eletrodo tipo penetração para alimentos sólidos e semissólidos, modelo 2AO4 GF (Analyser, São Paulo, Brasil). A medição foi realizada diretamente nos leites fermentados.

A acidez foi quantificada utilizando-se o método de titulação para expressão em equivalentes de ácido láctico (IAL, 2008). Para isso 10 g de FT e FC foram homogeneizados com 100 mL de água destilada em BagMixer 400 (Inter Science, St. Nom, França) por 2 minutos. A titulação do F.T seguiu mesma recomendação realizada ao subproduto de caju (item 3.2) devido a sua coloração intensa. Por outro lado, a FC foi titulada com uso de NaOH 0,10 e 3 gotas de indicador fenolftaleína (solução etanólica a 1,5%). O volume de solução titulada foi utilizado para calcular a acidez em equivalentes de ácido láctico. O pH e a acidez foram avaliadas ao longo do tempo de refrigeração nos dias 1, 7, 14, 21 e 28.

A composição centesimal das formulações de leite fermentado foi realizada para as amostras apenas do dia 1 e seguiu as mesmas metodologias utilizadas no SC (item 3.2). Exceção foi feita à análise de fibras, que foi estimada com base na quantidade adicionada de SC na formulação teste (2,5%). O conteúdo de carboidratos disponíveis das amostras foi calculado pela diferença do total de proteínas, lipídios, cinzas e umidade e fibra alimentar.

4.2 Avaliação do perfil de ácidos graxos, compostos fenólicos totais e atividade antioxidante dos leites fermentados

Amostras de FT e FC foram submetidas à extração de lipídios, assim como esterificação e uso de cromatográfica gasosa acoplada a espectrometria de massas para detecção de perfil de ácidos graxos. Para isso a metodologia seguiu mesmos procedimentos utilizados no item 3.3.

Extratos metanólicos foram feitos das formulações F.T e F.C nos dias de armazenamento 1, 14 e 28 para avaliação dos compostos fenólicos totais e atividade antioxidante tal qual foi realizada no Subproduto de Caju nos itens 3.4, 3.5 e 3.6. O diferencial para os leites fermentados foi na quantidade usada dos mesmos para fazer as extrações, em que 5,0 g foi usado.

4.3 Determinação da viabilidade dos microrganismos no leite fermentado durante armazenamento.

A viabilidade da cultura probiótica e *starter* dos 3 lotes de leites fermentados foi determinada durante o armazenamento em refrigeração (4°C) para os dias 1, 7, 14, 21 e 28. Porções de 10 g das amostras (retiradas de potes plásticos independentes) foram misturadas com 90 mL de solução salina estéril (0,85%), com subsequentes diluições em série. A contagem dos microrganismos foi expressa em log UFC/g a partir da técnica *pour plate* em que 1 mL das diluições foram misturadas em profundidade com base no meio de cultura e condições de cultivo anteriormente especificadas (Tabela 1).

4.4 Viabilidade de microrganismos durante condições gastrointestinais *in vitro*.

Esse parâmetro foi investigado nas amostras de leite fermentado, cujos tempos de armazenamento simulassem o acesso do consumidor ao produto (dias 7, 14 e 28). Para isso, foi utilizada metodologia de simulação das condições gastrointestinais previamente adaptada por Bedani et al. (2014a) para avaliar a sobrevivência da cepa probiótica e *starter*.

Foram usadas triplicadas das formulações de leite fermentado (FT e FC), em que porções foram diluídas 1:10 em água peptonada esterilizada (0,1%). Alíquotas de 10 mL dessas diluições foram dispostas em frascos reagente graduados de 100 mL (Schott, Mainz, Alemanha) e tiveram o pH ajustado para 2,0 – 2,5 com HCl (1 N), seguido de adição de pepsina (Sigma-Aldrich, Estados Unidos) e lipase (Aldrich Chemical Company, Estados Unidos) em concentrações finais de respectivamente de 3g / L e 0,9 mg / L. Esses frascos foram incubados por 2 horas em banho metabólico (MA-095, Marconi, Brasil) a 37°C e 150 RPM de agitação (fase gástrica - FG).

Após a etapa gástrica, o pH foi ajustado para 4,5 - 5,5 com solução tampão (NaOH com $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$), seguido da adição de sais biliares e pancreatina (Sigma-Aldrich, Estados Unidos) até concentrações de 10 g/ L e 1 g/ L respectivamente. Seguiu-se de novo período de incubação por 2 horas em banho metabólico a 37°C e 150 RPM (fase entérica 1 - FE1). Após essa fase, seguiu-se da última em que o pH foi aumentado para 6,5 - 7,5 com solução tampão (NaOH com $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, pH 12,0), mantendo as mesmas concentrações de sais biliares e pancreatina da fase anterior. Os frascos foram, finalmente, incubados por mais 2 horas, a 37°C e 150 RPM (fase entérica 2 - FE2), terminando as 6 horas de teste.

A quantificação das culturas probióticas e *starter* foi realizada com alíquotas coletadas de triplicatas no tempo 0, após 2 horas (FG), 4 horas (FE1) e 6 horas (FE2). Foi utilizado 1 mL de diluições seriadas em solução peptonada tamponada estéril (0,1%) nas fases que simularam

as condições gastrointestinais (e solução salina 0,85% estéril para o tempo 0). As alíquotas de diluições seriadas foram submetidas à contagem por meio da técnica de *pour plate* em ágar e em condição de incubação específicos (Tabela 1). Os resultados finais foram expressos em log UFC / g de cada formulação de leite fermentado.

5. Avaliação dos leites fermentados no SEMH®.

As formulações do leite fermentado FT e FC foram submetidas a condições de digestão *in vitro*, utilizando-se o Simulador de Ecossistema Microbiano Humano (SEMH®), em parceria com a Universidade Estadual de São Paulo (UNESP), Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara. Pretendeu-se com esse estudo, simular a microbiota intestinal de adulto humano saudável e avaliar o impacto que o consumo das formulações do leite fermentado probiótico, com e sem SC, poderiam ter na composição de microrganismos da microbiota, assim como sobre parâmetros funcionais, como compostos fenólicos, atividade antioxidante e quantidade e qualidade de ácidos graxos dentro dos reatores.

5.1 Especificações e protocolo de análises em SEMH®

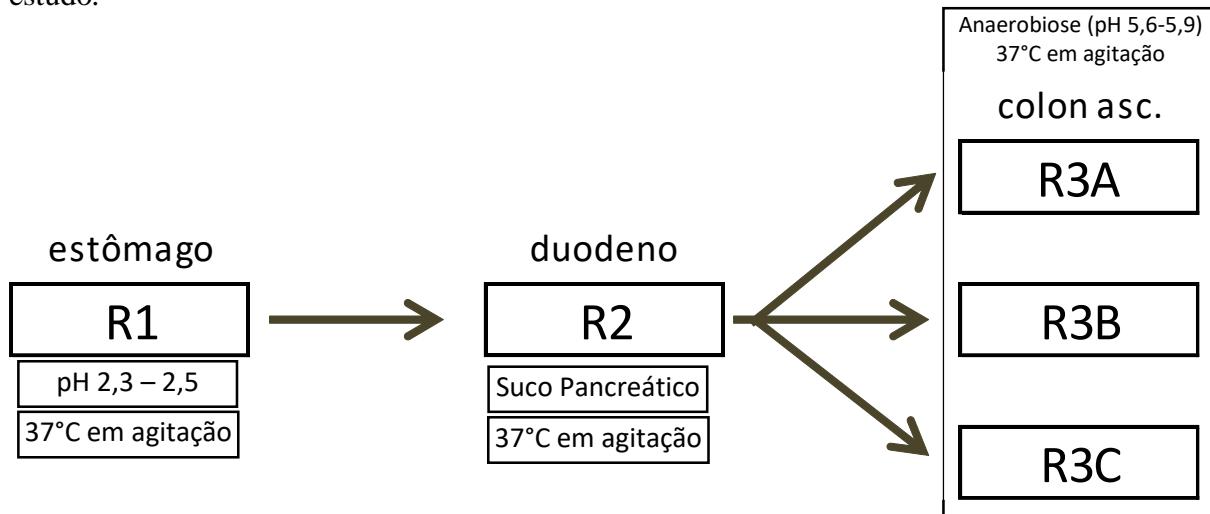
Para as investigações dessa tese, o SEMH® foi adaptado como mostra a Figura 3, em que o sistema foi constituído de 5 reatores, seguindo especificações de Molly et al. (1994) e Possemiers et al. (2004), para simular passagem do alimento pelo estômago (R1), duodeno (R2) e, a partir daí porções foram igualmente subdivididas, de forma simultânea, aos três últimos reatores que representam uma triplicata da porção ascendente do intestino grosso (R3_A, R3_B e R3_C).

As condições de funcionamento do sistema eram em sua maioria automatizadas, com exceção da manutenção da anaerobiose, obtida pelo influxo manual diário de N₂ nos reatores R3 e do descarte dos líquidos dos reatores, que precisavam ser manualmente recolhidos dos frascos de descarte. Todos os 5 reatores permaneceram em constante agitação com barras magnéticas a 100 RPM, a 37°C, e bombas de infusão automatizadas por computador se encarregaram de fazer a sucção dos leites fermentados e meio carboidrato, transferência dos conteúdos entre reatores, adição de suco pancreático no R2 e de soluções básicas (0,5 N de NaOH) e ácidas (0,5 N de HCl) para a manutenção das faixas de pH do R1 (estômago, 2,3 – 2,5) e dos R3_A, R3_B e R3_C (cólon ascendente, 5,6 – 5,9). O meio carboidrato especificado compreende um meio de alimentação à base de carboidratos que foi inoculado durante todas as fases experimentais dentro do sistema, seja isoladamente para padronização do inóculo fecal ou concomitante às formulações do leite fermentado. Esse líquido se tratava de um caldo, cuja

composição era: 2,0 g/ L de pectina, 1,0 g/ L de xilana, 3,0 g/ L de amido, 0,4 g/ L de glicose, 3,0 g/ L de extrato de levedura, 1,0 g/ L de peptona, 4,0 g/ L de mucina e 0,5 g/ L de cisteína (POSSEMIERS et al., 2004).

O funcionamento do sistema se deu pela introdução diária de leite fermentado e ou meio carboidrato, com permanecia de 2 horas no reator do estômago (R1), seguido de passagem automática e permanência por 4 horas no reator do duodeno (R2), em que havia adição automática de suco pancreático. Finalmente, porções do líquido de digestão do R2 eram equitativamente subdivididas entre os compartimentos R3, A, B e C, aonde permaneceram em agitação e em fermentação por um período total de 20 horas.

Figura 3. Esquematização do Microbiano Intestinal Humano (SEMH®) usado no presente estudo.



Fonte: próprio autor. R1: digestão estomacal. R2: digestão duodenal. R3_A, R3_B e R3_C: triplicata de fermentação em microbiota do cólon ascendente.

A fermentação colônica dos três últimos reatores foi possibilitada pela utilização de amostras fecais humanas doadas por adultos saudável e sem histórico de uso de antibióticos por, no mínimo, 6 meses. Foram coletadas 3 porções fecais frescas (aproximadamente 10 g) com intervalo de 1 dia entre cada coleta. As amostras foram prontamente encaminhadas para laboratório e diluídas em 100 mL de tampão fosfato esterilizado (0,1 mol/L em pH 7,0) e homogeneizadas por 2 minutos em BagMixer 400 (Inter Science, St. Nom, França). Essa mistura foi centrifugada por 15 minutos a 9.000 rpm sob refrigeração (modelo 2-16PK, Sigma, Alemanha) para a remoção de partículas suspensas. Ao final, todos os sobrenadantes foram homogeneizadas em um só conteúdo e alíquotas de 50 mL foram subdivididas, para serem inoculados nos compartimentos R3_A, R3_B e R3_C.

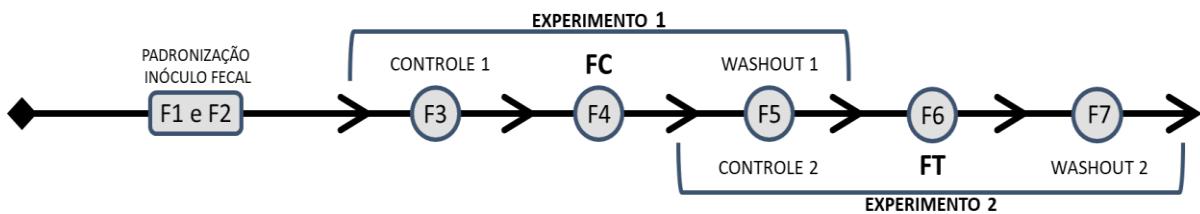
Durante todo o protocolo, as condições de anaerobiose foram mantidas pela inoculação de N₂ dentro dos reatores. A partir da Fase 3, alíquotas de 20 mL de cada um dos reatores R3 foram colhidas no último dia e encaminhadas para análises de composição de microbiota e dos parâmetros funcionais.

O apêndice C apresenta as etapas do experimento total no SEMH® detalhadas minuciosamente. O protocolo foi desenvolvido com base nos estudos de Duque et al. (2016) e Freire et al. (2017) e teve duração total de 39 dias, subdivididos em 7 fases e 2 Experimentos. As características de cada fase foram:

- **Fase 1 ou F1 (7 dias):** Fase de padronização da microbiota fecal em cada um dos 3 reatores R3. Inoculação de 200 mL/ dia de meio carboidrato diretamente nos R3_A R3_B e R3_C, contendo 50 mL de suspensão fecal previamente preparada (adicionada no primeiro dia dessa fase);
- **Fase 2 ou F2 (7 dias):** Continuação da fase anterior. Inoculação de 200 mL/ dia de meio carboidrato diretamente nos R3_A R3_B e R3_C para continuidade e finalização da padronização da microbiota intestinal;
- **Fase 3 ou F3 (5 dias):** Fase controle 1 com microbiota já padronizada nos 3 reatores R3. Inoculação de meio carboidrato (200 mL/dia) associado ao suco pancreático (60 mL/dia);
- **Fase 4 ou F4 (5 dias):** Fase experimental 1. Inoculação da formulação de leite fermentado probiótico sem subproduto de caju (FC – 600 mL/ dia), meio carboidrato (300 mL/ dia) e suco pancreático (240mL/dia);
- **Fase 5 ou F5 (5 dias):** Fase de *washout* 1, ou controle 2. Inoculação de meio carboidrato (900 mL/ dia) e suco pancreático (240mL/ dia);
- **Fase 6 ou F6 (5 dias):** Fase experimental 2. Inoculação da formulação de leite fermentado com 2,5% de subproduto de caju (FT – 600 ml/ dia), meio carboidrato (300 mL/ dia) e suco pancreático (240 mL/ dia);
- **Fase 7 ou F7 (5 dias):** Fase *washout* 2. Inoculação de meio carboidrato (900 mL/ dia) e suco pancreático (240mL/ dia);

As fases supracitadas foram estruturadas nos Experimentos 1 e 2 detalhados abaixo e conforme Figura 4. Essa divisão de experimentos permitiu a coleta dos resultados para os parâmetros de compostos fenólicos totais, atividade antioxidante, perfil de ácidos graxos, contagem de microrganismos por *drop plate*, e quantificação de grupos bacterianos por qPCR.

Figura 4 – Protocolo metodológico do SEMH®, subdividido em fases e experimentos.



Fonte: próprio autor. F1, F2, F3, F4, F5, F6 e F7 representam as fases do protocolo dividido em 2 experimentos. FC – Formulação Controle de Leite Fermentado sem subproduto do caju. FT – Formulação Controle de Leite Fermentado com 2,5% de subproduto do caju.

- **Experimento 1:** Realizado com as Fases 3, 4 e 5, em que o inóculo fecal padronizado (F3) foi o Controle 1 desse experimento; seguido da fase com inoculação com FC (F4) e da fase de *washout* 1 com passagem somente do meio carboidrato (F5);
- **Experimento 2:** Realizado com as Fases 5, 6 e 7, em que o *washout* 1 (F5) foi considerado o Controle 2 desse experimento; seguido da fase com inoculação com FT (F6) e da fase de *washout* 2 com passagem somente de meio carboidrato (F7).

A realização dessa subdivisão experimental possibilitou compreender de maneira independente como cada formulação de leite fermentado impactou na dinâmica dos parâmetros avaliados. Assim foi possível compreender as implicâncias de antes, do durante e do após a utilização dos leites fermentados; seja unicamente com probiótico e *starter* (FC), seja na junção dos microrganismos com o subproduto de caju desidratado (FT).

5.2 Avaliação do perfil de ácidos graxos, compostos bioativos e atividade antioxidante dos conteúdos dos reatores do SEMH®

Alíquotas dos reatores R3_A, R3_B e R3_C das fases 3 (controle), 4 (adição de FC) e 6 (adição de FT) foram submetidas à extração de lipídios, assim como esterificação e uso de cromatográfica gasosa acoplada a espectrometria de massas para detecção de perfil de ácidos graxos. Para isso a metodologia seguiu mesmos procedimentos utilizados no item 3.3.

Adicionalmente extratos metanólicos também foram feitos de todos os reatores e fases para avaliação dos compostos fenólicos totais e atividade antioxidante. Foi utilizada a mesma metodologia feita no Subproduto de Caju nos itens 3.4, 3.5 e 3.6. O diferencial para o atual caso foi na quantidade usada dos líquidos dos reatores, com utilização de 10 g e os resultados foram avaliados comparando-se o perfil de ácidos graxos dos reatores com os das respectivas formulações de leite fermentado neles inseridos.

5.3 Análises microbiológicas do SEMH®.

Durante as fases anteriormente descritas, análises microbiológicas de controle do processo foram realizadas. Todas elas foram realizadas no último dia de cada fase, empregando-se semeadura em ágar seletivo pela técnica de *drop plate* (HERIGSTAD; HAMILTON; HEERSINK, 2001). Alíquotas de 1 mL do líquido de cada R_{3A}, R_{3B} e R_{3C} foram submetidas a diluições seriadas e triplicatas técnicas de 10 µL foram pipetadas em ágar para contagem de microrganismos (log UFC/ mL líquido de reator). Para isso, seguiu-se as condições de meio de cultura e de cultivo da Tabela 3.

Adicionalmente, foi investigada a viabilidade do microrganismo probiótico nas formulações de leite fermentado nas Fases 4 (FC) e 6 (FT), antes de ser inoculado no SEMH®, assim como após passagem pelas condições simuladas no R1 e R2. Para isso, porções de 1 mL foram coletadas em três dias consecutivos imediatamente antes de serem inoculados no SEMH® (tempo 0 h) e após digestão estomacal (R1, 2 h) e duodenal (R2, 4 h). Os procedimentos de preparo pós-coleta das alíquotas assim condições de cultivo e meio de cultura da cepa probiótica utilizada foram os mesmos elencados no item 3.12 e na Tabela 1.

Tabela 3 – Condições de cultivo para contagem de grupos de microrganismos de interesse durante fases de experimento em SEMH®.

Grupo de microrganismos	Meio de Cultura	Condição de Incubação
Aeróbios totais e facultativos	Ágar Padrão de Contagem PCA, Acumedia, EUA.	37°C / 48h Aerobiose
<i>Clostridium</i> spp.	Ágar-agar para clostrídios RCA, Difco.	37°C por 48h em Anaerobiose*
<i>Bifidobacterium</i> spp.	Ágar-agar para clostrídios + NPKIT RCA.N, Difco.	37°C por 48h Anaerobiose*
<i>Lactobacillus</i> spp.	Ágar De Man Rogosa Sharpe MRS, Merck, Alemanha;	37°C por 48h Anaerobiose*

Fonte: próprio autor. (*) Sistema de anaerbiose Anaerogen® (Oxoid, ThermoFisher, Estados Unidos)

5.4 Preparo das amostras para análises da microbiota intestinal por PCR quantitativo (qPCR).

Técnicas de biologia molecular foram utilizadas para a investigação de grupos específicos da microbiota intestinal das Fases 3 a 7. Para isso, 2 mL dos 20 mL dos fluidos retirados dos R3 durante o experimento (Figura 4) foram separados para a quantificação de grupos bacterianos específicos usando Reação em Cadeia da Polimerase Quantitativa (*Quantitative Polymerase Chain Reaction* – qPCR).

As alíquotas retiradas dos R3 foram centrifugadas (9500 g, 10 minutos a 4°C) e o material retido (massa celular) foi lavado duas vezes com tampão Tris EDTA (TE) (Tris-HCL 10 mM, EDTA 1 mM, pH 8) e misturado em 499 µL de tampão PBS antes do tratamento com PMA (propídio monoazida). Para isso, foi adicionado PMA (Biotium, Inc., Hayward, Califórnia) até concentração final de 50 mM seguido de ativação por exposição à luz por 15 min (Padilha et al., 2016; Villarreal, 2013).

O qPCR permite a detecção mais rápida e específica dos organismos-alvo, porém sem distinção de células íntegras ou não. O uso de tratamento com PMA auxilia na exclusão de falso-positivos causados por DNA de células mortas, uma vez que o PMA se intercala ao DNA de células cuja membrana está danificada, impedindo fortemente a amplificação desse material genético (Gensberger et al., 2014; Nocker et al., 2009)

Após tratamento com PMA, a massa celular foi submetida à extração de DNA, com utilização do kit MagMAX™ (Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, EUA) com esferas magnéticas e DynaMag-2™ Magnet rack (Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, EUA), de acordo com as instruções do fabricante. A concentração e a qualidade da pureza do DNA extraídos foram medidas em espectrofotômetro NanoPhotometer® N60 (Implen, Munich, Alemanha).

5.5 Perfil de grupos bacterianos por qPCR

Com base em outros estudos que avaliaram o perfil da microbiota intestinal com uso de probióticos em SEMH®, uma série de grupos bacterianos em diferentes níveis taxonômicos foi selecionada (SIVIERI et al.; 2014; DUQUE et al., 2016; FREIRE et al., 2017; GARCÍA-VILLALBA et al., 2017). Dessa forma, selecionou-se os filos Actinobacteria, Firmicutes, Bacteroidetes e γ-Proteobacteria; os gêneros *Clostridium* spp. (cluster I), *Streptococcus* spp., *Bifidobacterium* spp. e *Lactobacillus* spp. Adicionalmente, foi avaliada a cepa probiótica previamente selecionada para aplicação nas formulações de leite fermentado, conforme será descrito posteriormente nos resultados - *Lacticaseibacillus paracasei* subsp. *paracasei* F-19®.

Para delineamento dos *primers* usados na reação de qPCR, todos os grupos acima foram investigados, com base nas especificações da Tabela 4. As únicas exceções, conforme consta no anexo A e B, foram *Streptococcus* spp. e filo Bacteroidetes, cujos *primers* foram delineados especificadamente para o atual estudo a partir de investigações preliminares de cepas comumente encontradas no trato intestinal humano (BERMAN, 2012; FLINT; DUNCAN, 2014; WEXLER, 2007). Para o desenho dos *primers* e evitando-se a formação de *hairpin*, autodímero e heterodímero, foram utilizadas as ferramentas PrimerQuest (Integrated DNA

Technologies, Coralville, Iowa, EUA) e OligoAnalyzer (Integrated DNA Technologies, Coralville, Iowa, EUA). Nas sequências dos *primers* e alvos, foi utilizada a ferramenta de alinhamento CLUSTAL-W (<http://genome.kribb.re.kr>), associada ao software Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) versão X (Kumar et al., 2018) e, em seguida, alinhado com as sequências de banco de dados por BLAST (www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST).

A viabilidade dos microrganismos por qPCR foi determinada, usando o termociclador do sistema de tempo real ABI 7500™ (Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, EUA). As reações de amplificação foram compostas por 12,5 µL de 2X Power SYBR® Green PCR Master Mix (Applied Biosystems™), os *primers* na concentração apropriada e água ultrapura em quantidade suficiente para completar 25 µL. Todas as reações foram feitas em triplicata usando os *primers* elencados na Tabela 4 e especificações de reagentes e parâmetros de termociclagem da Tabela 5.

As curvas-padrão foram construídas com diluições seriadas em 10 vezes do DNA genômico isolado das culturas puras entre 10^2 a 10^8 cópias do genoma por reação de amplificação. Os números de células viáveis foram determinados pela comparação do ciclo limiar (C_t) de cada amostra com as curvas padrão (Padilha et al., 2016). As culturas puras usadas foram: *Streptococcus thermophilus* TH-4 (tamanho do genoma: 1,83195 Mb; NCBI RefSeq: NZ_CP038020.1) para Firmicutes e *Streptococcus* spp.; *Bifidobacterium longum* 46 (tamanho do genoma: 2,39546 Mb; NCBI RefSeq: NZ_CP026999.1) para Actinobacteria e *Bifidobacterium* spp.; *Clostridium perfringens* (tamanho do genoma: 3,35051 Mb; NCBI RefSeq: NC_008261.1) para *Clostridium* spp. (cluster I); *Escherichia coli* (tamanho do genoma: 5,12122 Mb; NCBI RefSeq: NC_000913.3) para γ -Proteobactérias; *Lacticaseibacillus paracasei* subsp. *paracasei* F19 (tamanho do genoma: 3,063 Mb; NCBI RefSeq: CP016355.1) para própria identificação; *Lacticaseibacillus paracasei* subsp. *paracasei* 431 (genome size: 3,063 Mb; NCBI RefSeq: CP016355.1) para *Lactobacillus* spp. Para identificação de Bacteroidetes, DNA sintético com 400bp (Geneart, Regensburg, Alemanha) foi desenhado as partir das mesmas espécies bacterianas usadas para modelagem de seus *primers*. Resultados finais foram expresso em log Número de Células Equivalente/ mL do líquido dos reatores R3.

Tabela 4. *Primers* utilizados para a quantificação de células viáveis de diferentes níveis taxonômicos bacterianos por qPCR.

Taxonomia	Código primer Forward/Reverse		Sequência (5'-3')	Referência
Actinobacteria	Act920f3	F	TACGGCCGCAAGGCTA	Bacchetti De Gregoris et al., 2011
	Act1200R	R	TCRTCCCCCACCTCCTCCG	
Firmicutes	F	F	GTCAGCTCGTGTCTGA	Mello et al., 2018
	F	R	CCATTGTAKYACGTGTGT	
Bacteroidetes	BactF	F	CAGCAGTGAGGAATATTGGTCAATGG	Esse estudo
	BactR	R	ACCGTGCCTCAATCGGCTA	
γ -Proteobacteria	1080 γ F	F	TCGTCAGCTCGTGTGTGA	Bacchetti De Gregoris et al., 2011
	γ 1202R	R	CGTAAGGGGCCATGATG	
<i>Clostridium</i> spp (cluster I)	CI-F1	F	TACCHRAGGAGGAGGCCAC	Song et al., 2004
	CI-R2	R	GTTCTTCCTAAATCTCTACGCAT	
<i>Streptococcus</i> spp	StreptF	F	GGTAATAAACCGGAGGAAGGTG	Esse estudo
	StreptR	R	ATTGTAGCACGTGTGTAGCC	
<i>Bifidobacterium</i> spp.	BiffF	F	GGGTGGTAATGCCGGATG	Mello et al., 2018
	BiffR	R	TAAGCCATGGACTTTCACACC	
<i>Lactobacillus</i> spp.	Lacto-F	F	TGGAAACAGRTGCTAATACCG	Byun et al., 2004
	Lacto-R	R	GTCCATTGTGGAAGATTCCC	
<i>Lacticaseibacillus</i> <i>paracasei</i> F-19®	CRISPR2F	F	CGTGTGCCGATATAATGGGACG	Sieuwerts and Håkansson, 2016
	CRISPR2R	R	CCAAAGATCATCAAGCGTGCCAT	

Tabela 5. Parâmetros de reagentes e termociclagem utilizados para quantificação de células viáveis em diferentes níveis taxonômicos bacterianos por qPCR.

Taxonômia	Reagentes	Especificações de termociclagem	Referencial metodológico
Actinobacteria e γ -Proteobacteria	Concentração final de primers 0,3 μ M e 2,5 μ L de DNA	Início a 95 °C (5 min), 30 ciclos a 95 °C (15s), 61,5°C (30s) e 72°C (40s) e final a 72 °C (5 min)	Bacchetti De Gregoris et al. (2011)
Firmicutes	Concentração final de primers 0,5 μ M e 1,25 μ L de DNA	Início a 95 °C por 10 min, 40 ciclos a 95 °C (15s) e 60°C (40s).	Mello et al. (2018)
Bacteroidetes	Concentração final de primers 0,25 μ M e 5,0 μ L de DNA	Início a 50 °C (2 min), 95 °C (10 min), 40 ciclos a 95 °C (15s) e 58,4 °C (1 min).	Este estudo
<i>Clostridium</i> spp. (cluster I)	Concentração final de primers 300 nM, 5,0 μ L de DNA	Início a 95 °C (2 min), 30 ciclos a 95 °C (15s) e 58°C (1min).	Song et al. (2004)
<i>Streptococcus</i> spp.	Concentração final de primers 0,25 μ M e 5,0 μ L de DNA	Início a 50°C (2 min), 95 °C (10 min), 40 ciclos a 95 °C (15s) e 58°C (1min).	Este estudo
<i>Bifidobacterium</i> spp.	Concentração final de primers a 10 pmol/ μ L e 0,5 μ L de DNA	Início a 95°C (5 min), 40 ciclos de 95°C (10s) e 60°C (40s).	Mello et al., 2018
<i>Lactobacillus</i> spp	Concentração final 0,25 μ M e 5,0 μ L de DNA	Início a 50°C (2min), 95 °C (10min), 40 ciclos a 95 °C (15s) e 62°C (1min)	Byun et al. (2004),
<i>Lacticaseibacillus paracasei</i> F-19®	Concentração final de primers 0,25 μ M e 5,0 μ L de DNA	Início a 50°C (2 min), 95 °C 10 min, 40 ciclos a 95 °C (15s) e 60°C (1min).	Sieuwerts e Håkansson (2016)

6. Análise estatística

Todas as análises estatísticas foram realizadas com o pacote estatístico Minitab, versão 17.3.1 para Windows (Minitab Inc. 2013, EUA). Os resultados foram submetidos à análise descritiva como média, desvio padrão ou erro padrão da média. Para dados não paramétricos foi apresentada a mediana seguida de primeiro e terceiro quartil.

Para comparar os resultados, foram realizados os testes de Levene para igualdade de variâncias e Shapiro-Wilk para avaliação da distribuição normal. Dependendo desses resultados, testes paramétricos ou não paramétricos com um grau de significância de 95 ou 99% foram utilizados, seguindo da comparação de média ou mediana apropriada. Havendo necessidade, os dados que não assumiram distribuição normal foram submetidos à transformação de Johnson, e nesse caso, não havendo igualdade de variâncias as médias foram emparelhadas e comparadas pelo teste Games-Howell com nível de significância de 95 ou 99%.

Valores quantificados em qPCR do perfil de microbiota intestinal em SEMH® foram submetidos à Análise de Componentes Principais (PCA) usando software R Studio (Boston, EUA). Foi usada matriz de correlação para explicação da variância dos dados em 2 componentes principais. Os resultados foram expressos em duas PCA, correlacionando os componentes principais com as fases experimentais, os filos ou gênero e espécie dos grupos bacterianos.

7. RESULTADOS E DISCUSSÃO

7.1 Características fisico-químicos e funcionais do subproduto de caju (S.C)

A Tabela 6, 7 e 8 resumem os dados aferidos da composição do subproduto de caju, quanto a composição centesimal, atividade antioxidante, perfil de ácidos graxo e compostos fenólicos totais e respectivos perfis.

Quanto a composição centesimal, pode-se observar um perfil de alto teor proteico, próximo ou superior a certos cereais, como arroz integral, trigo e milho amarelo (SALDIVAR, 2016). Uma vez que o material avaliado representa a porção fibrosa retida após prensagem do pseudofruto destaque deve ser dado aos valores das fibras alimentares e valores superiores de fibra insolúvel eram esperados. O uso dessa matriz fibrosa como ingrediente pode ser um importante aliado para um incremento nos efeitos benéficos à saúde, como retenção de água e saciedade (fibra solúvel) ou efeitos intestinais regulatórios e maior volume de fezes (fração insolúvel) (O'SHEA et al., 2015; KAMAL-ELDIN, 2016). De fato, os valores obtidos para fibra dietética total foram superiores a farelos de trigo, centeio, aveia e cevada (KAMAL-ELDIN, 2016) e de outros subprodutos, tais como o de maçã (55,48 g/100 g), goiaba (44,30 g/100 g) e acerola (48,60 g/100 g) (MATEOS-APARICIO et al., 2020; MEDEIROS et al., 2019).

Tabela 6. Composição centesimal, pH e acidez do subproduto de caju desidratado

Parâmetro	Valor
Umidade (g/ 100 g)	2,85 ± 0,11
Cinzas (g/ 100 g)	1,25 ± 0,02
Proteínas (g/ 100 g)	10,67 ± 0,02
Carboidratos (g/ 100 g)	9,52 ± 0,13
Gorduras totais (g/ 100 g)	4,47 ± 0,11
Fibra total (g/ 100 g)	71,23 ± 0,02
Fibra insolúvel (g/ 100 g)	62,52 ± 0,02
Fibra solúvel (g/ 100 g)	8,71 ± 0,03
Valor energético (kcal/ 100 g)	120,97 ± 0,71
pH	4,79 ± 0,12
Acidez (g Ác. Málico/ 100 g)	1,37 ± 0,02

Valores representados em média e desvio padrão

Quanto aos parâmetros de pH e acidez, observou-se valores esperados, em virtude da origem do subproduto ser o pseudofruto que apresenta pH variando de 3,5 - 4,5 e acidez titulável em equivalentes de ácido málico entre 0,22 – 0,55 (FILGUEIRAS et al., 1999). Os valores

encontraram-se mais elevados no S.C, em que um pH próximo ao pseudofruto de origem foi observado, apesar de maiores valores de acidez titulável. Provavelmente, o processo de desidratação do subproduto interferiu na maior concentração dos compostos naturalmente ácidos detectados nos ensaios titulométricos.

O conteúdo de compostos fenólicos totais de subprodutos de frutas tem sido bastante investigado pelo fato de uma clara tendência desses compostos estarem mais retidos nas partes não tradicionalmente consumidas, como casca, sementes, polpa fibrosa residual (GONZÁLEZ-AGUILAR et al., 2017; JAKOBÉK & MATIĆ, 2019). Nesse quesito, o SC apresentou valores superiores a outros estudos que investigaram subprodutos de maçã, banana e laranja (HERNÁNDEZ-CARRANZA et al., 2016).

Quanto ao perfil dos principais compostos fenólicos (tabela 7), os valores de ácido siríngico e elágico superaram os encontrados no estudo com subprodutos liofilizados de caju, acerola e goiaba que variaram de 1,0 – 49,0 mg/100g para ácido elágico e 5,0 – 50,6 mg/100g para ácido siríngico (SABINO BATISTA et al., 2018). Moo-Huchin et al. (2015) identificaram menores valores de ácido elágico em extratos metanólicos da casca de caju e Medeiros et al. (2019) identificaram ácidos fenólicos (salicílico e vanílico) além de flavonoides (queracetina, miricetina, narigenina, etc) em subprodutos liofilizados de caju. Cromatogramas representativos dos principais compostos fenólicos estão apresentados nos apêndice A e B.

A diversidade de resultados quanto ao perfil de compostos fenólicos em subprodutos só confirma a necessidade constante de investigação do potencial bioativo dessas matrizes. A riqueza das espécies fenólicas e fibras dietéticas de frutas (subprodutos ou não) foram investigadas com modelos animais e simuladores de fermentação colônica. Esses estudos corroboraram em resultados positivos quanto à capacidade modulatória da microbiota intestinal, na integridade da mucosa intestinal, níveis séricos e resistência à insulina (ETXEBERRIA et al., 2015; KOUTSOS et al., 2017; CHACAR et al., 2018)

A capacidade de inativação do radical livre DPPH[·] representa uma alternativa de ótimo custo benefício para detecção da capacidade antioxidante de diversos substratos. No cenário do estudo foi possível observar que os valores elevados dos compostos fenólicos totais implicaram em uma capacidade de inibição alta. Isso foi mais bem observado quanto ao valor do IC₅₀, que define a concentração de extrato necessária para inativar a concentração inicial de DPPH[·] em 50%. Logo, quanto menores os valores de IC₅₀, mais potencial antioxidante a amostra apresenta.

Tabela 7. Compostos fenólicos totais, perfil de fenólicos e atividade antioxidante.

Parâmetro	Valor
Compostos Fenólicos Totais (mg eqAG/ 100g)	486,57 ± 10,06
Ácido siríngico (mg/ 100g)	146,8 ± 7,1
Glicosídeo de queracetina (mg/ 100g)	16,8 ± 1,2
Catequina (mg/ 100g)	40,4 ± 5,4
Ácido Elágico (mg/ 100g)	122,0 ± 1,4
Atividade antioxidante DPPH· (% inibição)	88,78 ± 0,13
Atividade antioxidante DPPH· IC ₅₀ (mg/ mL)	1,16 ± 0,03

Valores representados em média e desvio padrão. DPPH· radical livre 2,2-difenil-1-picrihidrazil. IC₅₀: concentração de inibição que inativa 50% do DPPH· em solução.

Quanto ao perfil de ácidos graxos, pode-se observar uma maior representatividade dos ácidos oleico, palmítico e esteárico, assim como a presença de ácidos graxos essenciais como linolênico e linoleico em uma proporção próxima a 1:2 no conteúdo de óleo extraído do subproduto. Outros estudos que detectaram o perfil de ácidos graxos de origem vegetal demonstraram percentual de composição menor para ácido oleico em óleo de soja, cânhamo e tremoço, assim como para o ácido linolênico em aveia quando comparados ao extraído do subproduto de caju (MULTARI et al., 2019). O perfil de ácidos graxos mono ou polinsaturados diferencial do subproduto de caju pode ser visto como mais um fator positivo quanto sua capacidade de agregar compostos essenciais no desenvolvimento de novos alimentos.

Tabela 8. Composição de ácidos graxos do óleo extraído de subproduto de caju desidratado.

Ácido Graxo	Percentual de composição	μg Ácido Graxo/g óleo
Ácido palmítico (C16:0)	31,3%	867,6
Ácido palmitoléico (C16:1)	1,6%	43,8
Ácido esteárico (C18:0)	12,6%	350,2
Ácido oleico (C18:1 ω-9)	48,1%	1336,6
Ácido linoleico (C18:2 ω-6)	3,3%	90,2
Ácido linolênico (C18:3 ω-3)	2,0%	54,5
Ácido cis-13-eicosanóico	0,8%	33,4

7.2 Testes microbiológicos de fermentabilidade em SC e escolha do microrganismo probiótico

As avaliações para escolha da cepa probiótica mais adaptada ao SC foram feitas em etapas com avaliação do comportamento das cepas no tempo máximo de fermentação ($\Delta 48$). A partir dessa etapa, após a exclusão das cepas não pertinentes, seguiu-se de avaliação da variação de multiplicação nas primeiras 24 horas ($\Delta 24$) e entre 24 e 48 horas ($\Delta 24-48$). Paralelamente,

foram feitas comparações para cada uma das cepas com seu meio de cultura controle de fermentação sem a adição de SC Esse controle foi realizado, no sentido de avaliar o quanto relevante foi a presença desse substrato na multiplicação de cada cepa bacteriana testada.

Os valores da Tabela 9 referem-se ao Δ48 das 10 cepas probióticas testadas durante a fermentação no caldo MRSm com 1% SC Foi observado que *Lactobacillus reuteri* RC-14 foi a cepa que apresentou a maior multiplicação relativa (3,32 log UCF / mL), porém não diferente ($p > 0,05$), quando comparada às cepas *L. paracasei* 431, *L. acidophilus* LA-5, *L. paracasei* F19 e *B. animalis* BB-12. Com base nessa constatação, as comparações seguintes foram feitas apenas para essas cepas, em relação aos seus grupos controles (mMRS sem SC)

Na Tabela 10 pode-se observar que apenas o Δ48 das cepas RC-14 e F-19 foi estatisticamente maior na presença de SC ($p < 0,05$). As cepas 431 e BB-12 não diferiram significativamente dos controles sem SC e a LA-5 apresentou multiplicação maior no controle ($p < 0,05$) o que implica em uma capacidade irrelevante ou menor do SC em ser utilizado como substrato por esses microrganismos.

Tabela 9. Variação de população dos microrganismos probióticos após 48 horas de fermentação no caldo MRSm com subproduto de caju e em comparação ao grupo controle.

Cepa	Δ48 – MRSm + S.C
<i>L. reuteri</i> RC-14	3,32 ± 0,13 ^a
<i>L. paracasei</i> subsp. <i>paracasei</i> 431	2,92 ± 0,17 ^{ab}
<i>L. acidophilus</i> LA-5	2,87 ± 0,09 ^{ab}
<i>L. paracasei</i> subsp. <i>paracasei</i> F19	2,80 ± 0,10 ^{ab}
<i>B. animalis</i> subsp <i>lactis</i> BB-12	2,79 ± 0,33 ^{ab}
<i>L. rhamnosus</i> GR-1	2,56 ± 0,08 ^{bc}
<i>L. rhamnosus</i> LGG	2,56 ± 0,13 ^{bc}
<i>B. longum</i> subsp. <i>infantis</i> BB-02	2,28 ± 0,19 ^{bc}
<i>L. fermentum</i> PCC	2,23 ± 0,10 ^{bc}
<i>B. longum</i> BB-46	2,02 ± 0,16 ^c

MRSm + SC: caldo MRS modificado com 1% de subproduto de caju. Δ48: Variação de população entre o tempo 0 e 48 horas de fermentação (log UFC mL⁻¹) representados em média ± erro padrão da média. Valores seguidos de letras diferentes representam diferença significativa para o teste de Tukey ($p < 0,05$).

Tabela 10. Variação de população dos microrganismos probióticos após 48 horas de fermentação no caldo MRSm com e sem subproduto de caju.

Cepa	$\Delta 48 - \text{MRSm} + \text{SC}$	$\Delta 48 - \text{MRSm C.}$
<i>L.reuteri</i> RC-14	$3,32 \pm 0,13^{\text{a}}$	$2,57 \pm 0,13^{\text{b}}$
<i>L. paracasei</i> subsp. <i>paracasei</i> 431	$2,92 \pm 0,17^{\text{a}}$	$2,79 \pm 0,06^{\text{a}}$
<i>L. acidophilus</i> LA-5	$2,87 \pm 0,09^{\text{b}}$	$3,14 \pm 0,02^{\text{a}}$
<i>L. paracasei</i> subsp. <i>paracasei</i> F19	$2,80 \pm 0,10^{\text{a}}$	$2,35 \pm 0,03^{\text{b}}$
<i>B. animalis</i> subsp <i>lactis</i> BB-12	$2,46 (2,17 - 3,67)^{\text{a}}$	$2,64 (2,52 - 2,70)^{\text{a}}$

MRSm + S.C: caldo MRS modificado com 1% de subproduto de caju; MRSm Controle: caldo MRS modificado sem adição de subproduto de caju. $\Delta 48$: Variação de população entre o tempo 0 e 48 horas de fermentação ($\log \text{UFC.mL}^{-1}$) representados em média \pm erro padrão da média ou mediana (BB-12) e primeiro e terceiro quartis. Valores seguidos de letras diferentes na mesma linha representam diferença significativa para o teste *t* de student ($p < 0,05$) ou Kruskal-Wallis ($p < 0,05$).

Após esse primeiro critério de avaliação, seguiu-se para as comparações do $\Delta 24$ e $\Delta 24-48$. Para isso, as comparações foram feitas apenas com os microrganismos que se destacaram quanto ao $\Delta 48$ (RC-14, F-19, 431 e BB-12 e LA-5).

O valor de $\Delta 24$ (Tabela 11) da cepa BB-12 foi o maior, comparado às demais cepas, porém essa diferença só foi significativa quando comparada à cepa LA-5 ($p < 0,05$); não diferindo daquele obtido para as cepas RC-14, 431 e F-19 ($p > 0,05$). Com base nesse resultado e somado ao fato de que o $\Delta 48$ da LA-5 foi maior na ausência de SC ela foi desconsiderada para as comparações seguintes. A comparação do $\Delta 24$ das cepas restantes com seus respectivos grupos controles (Tabela 12) comprova que todas as cepas utilizaram o subproduto de caju como substrato, repercutindo em um aumento significativo de sua população ($p < 0,05$), quando comparado à fermentação sem SC.

Tabela 11. Variação de população dos microrganismos probióticos após 24 horas de fermentação no caldo MRSm com subproduto de caju.

Cepa	$\Delta 24 - \text{MRSm} + \text{SC}$
<i>B. animalis</i> subsp. <i>lactis</i> BB-12	$3,93 \pm 0,19^{\text{a}}$
<i>L. reuteri</i> RC-14	$3,64 \pm 0,07^{\text{a}}$
<i>L. paracasei</i> subsp. <i>paracasei</i> 431	$3,55 \pm 0,10^{\text{a}}$
<i>L. paracasei</i> subsp. <i>paracasei</i> F19	$3,36 \pm 0,22^{\text{ab}}$
<i>L. acidophilus</i> LA-5	$2,79 \pm 0,08^{\text{b}}$

MRSm + SC: caldo MRS modificado com 1% de subproduto de caju. $\Delta 24$: Variação de população entre o tempo 0 e 24 horas de fermentação ($\log \text{UFC.mL}^{-1}$) representados em média \pm erro padrão da média. Valores seguidos de letras diferentes representam diferença significativa para o teste Tukey ($p < 0,05$).

Tabela 12. Variação de população dos microrganismos probióticos após 24 horas de fermentação no caldo MRSm com e sem subproduto de caju.

Cepa	$\Delta 24 - \text{MRSm + SC}$	$\Delta 24 - \text{MRSm C.}$
<i>B. animalis</i> subsp <i>lactis</i> BB-12	$3,93 \pm 0,19^a$	$2,48 \pm 0,03^b$
<i>L. reuteri</i> RC-14	$3,64 \pm 0,07^a$	$3,27 \pm 0,02^b$
<i>L. paracasei</i> subsp. <i>paracasei</i> 431	$3,55 \pm 0,10^a$	$2,87 \pm 0,04^b$
<i>L. paracasei</i> subsp. <i>paracasei</i> F19	$3,36 (2,80 - 3,93)^a$	$2,52 (2,49 - 2,70)^b$

MRSm + SC: caldo MRS modificado com 1% de subproduto de caju; MRSm C.: caldo MRS modificado sem adição de subproduto de caju. $\Delta 24$: Variação de população entre o tempo 0 e 24 horas de fermentação (log UFC.mL⁻¹) representados em média \pm erro padrão da média ou mediana (F-19) e primeiro e terceiro quartis. Valores seguidos de letras diferentes na mesma linha representam diferença significativa para o teste *t* de Student ($p < 0,05$) ou Kruskal-Wallis ($p < 0,05$).

Considerando-se apenas essas cepas relevantes nas avaliações de $\Delta 48$ e $\Delta 24$, seguiu-se para a observação das últimas 24 horas de incubação ($\Delta 24-48$). A Tabela 13 demonstra que, nessa etapa da fermentabilidade, todas as cepas apresentaram diminuição de população. Todavia, apenas a RC-14 e F-19 não diferiram dos seus respectivos controles ($p > 0,05$). Isso leva a crer que, por mais que esse período da fermentação tenha repercutido em diminuição das populações, isso também foi observado na ausência de subproduto de caju para a RC-14 e F-19, diferentemente do BB-12 e 431 em que houve maior decréscimo no grupo com SC

Tabela 13. Variação de população dos microrganismos *starter* entre 24 e 48 horas de fermentação no caldo MRSm com e sem subproduto de caju.

CEPA	$\Delta 24-48 - \text{MRSm + SC}$	$\Delta 24-48 - \text{MRSm C.}$
<i>B. animalis</i> subsp <i>lactis</i> BB-12	$-1,15 \pm 0,40^b$	$0,14 \pm 0,04^a$
<i>L. reuteri</i> RC-14	$-0,31 \pm 0,11^a$	$-0,47 \pm 0,07^a$
<i>L. paracasei</i> subsp. <i>paracasei</i> 431	$-0,63 \pm 0,21^b$	$-0,08 \pm 0,08^a$
<i>L. paracasei</i> subsp. <i>paracasei</i> F19	$-0,68 (-1,17 - 0,18)^a$	$-0,21 (-0,28 - 0,11)^a$

MRSm + SC: caldo MRS modificado com 1% de subproduto de caju. $\Delta 24-48$: Variação de população entre o tempo 24 e 48 horas de fermentação (log UFC.mL⁻¹) representados em média \pm erro padrão da média ou mediana (F-19) e primeiro e terceiro quartis. Valores negativos representam diminuição de população durante referido espaço de tempo. Valores seguidos de letras diferentes na mesma linha representam diferença significativa para o teste *t* de Student ($p < 0,05$) ou Kruskal-Wallis ($p < 0,05$).

Após essa análise minuciosa do padrão de multiplicação dos microrganismos probióticos, pode-se afirmar que as duas cepas que melhor se adaptaram ao SC foram a *L. reuteri* RC-14 e *L. paracasei* F-19®. Porém, a cepa F-19® apresenta características interessantes de estabilidade genética, sobrevivência às condições digestivas e interação benéfica com o epitélio intestinal relacionado com regulação negativa de genes associados a patologias gastrointestinais (DI CERBO; PALMIERI, 2013). Outras evidências de estudos clínicos sumarizados por Jones

(2017) corroboram com mais alegações positivas do uso de *L. paracasei* F-19 associado a dietas ricas em fibras na melhora de inchaço e dor abdominal, assim como na influência desse probiótico na redução do acúmulo de gordura pela modulação de fatores de transcrição no metabolismo energético.

Outro estudo com as cepas probióticas aqui elencadas demonstrou, de forma semelhante, que tanto a RC-14 quanto a F-19 apresentaram boa adaptabilidade em subprodutos de frutas, okara ou farinha de amaranto após 24 e 48 horas de fermentação (VIEIRA et al., 2017). Por outro lado, outro relato demonstrou uma baixa viabilidade da cepa RC-14 em leites fermentados ao longo da vida de prateleira (HEKMAT; SOLTANI; REID, 2009). Dessa forma, somando todas essas evidências optou-se pela escolha da cepa F-19 para a aplicação em leite fermentado probiótico.

De forma coadjuvante ao processo de fermentação a investigação de 3 cepas *starter* foi realizada pelo mesmo ensaio de fermentabilidade. Os valores ilustrados na tabela 14 apresentam o $\Delta 48$ dessas cepas após fermentação em MRSm com 1% SC e nos grupos controles sem SC. Foi verificado que a cepa *Streptococcus thermophilus* STM-6 apresentou um aumento de população notoriamente superior àquele das cepas TH-4 e TA-40. Também foi detectado melhor resposta da cepa ST-M6 em MRSm + SC, quando comparado ao controle de fermentabilidade sem SC, para o qual foi observado uma diminuição da população bacteriana (Tabela 14).

Tabela 14. Variação de população dos microrganismos *starter* após 48 horas de fermentação no caldo MRSm com e sem subproduto de caju.

Cepas	$\Delta 48 - \text{MRSm} + \text{SC}$	$\Delta 48 - \text{MRSm C.}$
<i>S. thermophilus</i> ST-M6	$3,74 \pm 0,12^a$	$-0,21 \pm 0,15^b$
<i>S. thermophilus</i> TH-04	$-1,56 \pm 0,11^a$	$-2,19 \pm 0,10^b$
<i>S. thermophilus</i> TA-40	$-0,32 (-0,52 - -0,02)^a$	$-2,20 (-2,43 - -2,11)^b$

MRSm + SC: caldo MRS modificado com 1% de subproduto de caju. $\Delta 48$: Variação de população entre o tempo 0 e 48 horas de fermentação ($\log \text{UFC.mL}^{-1}$) representados em média \pm erro padrão da média ou mediana (TA-40) e primeiro e terceiro quartis. Valores positivos representam aumento de população e valores negativos diminuição de população. Valores seguidos de letras diferentes para uma mesma linha representam diferença significativa para o teste *t* de Student ($p < 0,05$) ou Kruskal-Wallis ($p < 0,05$).

Como se observa nas Tabelas 15 e 16, os valores de $\Delta 24$ e $\Delta 24-48$ da cepa ST-M6 continuaram como positivos (significando incremento de população bacteriana). O contrário foi observado em todos os grupos controles e com SC das demais cepas *starter*. Devido à melhor adaptabilidade da cepa ST-M6 frente às demais durante a avaliação do potencial

fermentativo, essa cepa representa a escolha mais adequada, para, juntamente com a cepa de *L. paracasei* F-19, serem utilizadas para formulação do leite fermentado.

Tabela 15. Variação de população dos microrganismos *starter* após 24 horas de fermentação no caldo MRSm enriquecido com e sem subproduto de caju.

Cepas	$\Delta 24 - \text{MRSm} + \text{SC}$	$\Delta 24 - \text{MRSm C.}$
<i>S. thermophilus</i> ST-M6	$0,85 \pm 0,13^a$	$0,11 \pm 0,04^b$
<i>S. thermophilus</i> TA-40	$-0,32 \pm 0,04^a$	$-0,76 \pm 0,08^b$
<i>S. thermophilus</i> TH-04	$-0,52 \pm 0,03^a$	$-0,71 \pm 0,17^a$

MRSm + SC: caldo MRS modificado com 1% de subproduto de caju. $\Delta 24$: Variação de população entre o tempo 0 e 24 horas de fermentação ($\log \text{UFC.mL}^{-1}$) representados em média \pm erro padrão da média. Valores positivos representam aumento de população e valores negativos diminuição de população durante referido espaço de tempo. Valores seguidos de letras diferentes para uma mesma linha representam diferença significativa para o teste *t* de Student ($p < 0,05$).

Tabela 16. Variação de população dos microrganismos *starter* entre 24 e 48 horas de fermentação no caldo MRSm enriquecido com e sem subproduto de caju.

Cepas	$\Delta 24-48 - \text{MRSm} + \text{SC}$	$\Delta 24-48 - \text{MRSm C.}$
<i>S. thermophilus</i> ST-M6	$2,89 \pm 0,07^a$	$-0,32 \pm 0,13^b$
<i>S. thermophilus</i> TA-40	$-0,02 \pm 0,08^a$	$-1,52 \pm 0,08^b$
<i>S. thermophilus</i> TH-04	$-1,03 \pm 0,10^a$	$-1,48 \pm 0,13^b$

MRSm + SC: caldo MRS modificado com 1% de subproduto de caju. $\Delta 24-48$: Variação de população entre o tempo 24 e 48 horas de fermentação ($\log \text{UFC.mL}^{-1}$) representados em média \pm erro padrão da média. Valores positivos representam aumento de população e valores negativos diminuição de população durante referido espaço de tempo. Valores seguidos de letras diferentes para uma mesma linha representam diferença significativa para o teste *t* de Student ($p < 0,05$).

7.3 Viabilidade dos microrganismos utilizados no leite fermentado durante o armazenamento refrigerado.

Após a escolha dos microrganismos probiótico e *starter*, houve a produção de 3 lotes do leite fermentado F.T (2,5% de SC) e controle FC (sem S.C). Os resultados da evolução da viabilidade da bactéria probiótica e *starter* se encontram estruturados na tabela 17. Ambas as formulações partiram de uma inoculação de probiótico e *starter* que variou de 8,2 até 8,7 log UFC/ mL e foram submetidos a uma temperatura média de 4,7°C de armazenamento durante 28 dias.

Comparando-se os grupos FT e F.C individualmente no decorrer da vida de prateleira, pode-se observar que a presença de subproduto pouco interferiu num aumento diferenciado de microrganismos. Em ambas as formulações valores superiores a 9,0 log UFC/mL para F-19® e 8,6 log UFC/mL para ST-M6® foram constatados em todos os dias de armazenamento

refrigerado. Por outro lado se comparados aos respectivos inóculos pré-fermentação esses valores foram até mais representativos ($> 0,5 \log \text{ UFC/mL}$) e estatisticamente significantes ($p < 0,05$). Comparado-se as diferentes formulações entre si em cada dia de armazenamento maiores valores ($p < 0,01$) foram encontrados na FT para a cepa probiótica (dia 14) e starter (dia 7), apesar que ambos foram inferiores a $0,5 \log \text{ UFC/mL}$.

Tabela 17. Viabilidade ($\log \text{ UFC/ mL}$) de cepas probiótica e *starter* em leite fermentado com e sem adição de subproduto de caju durante 28 dias em refrigeração.

Cepas/ Formulações	Inóculo	D1	D7	D14	D21	D28	
F-19®	F.C	$8,7 \pm 0,2^{\text{abA}}$	$9,1 \pm 0,2^{\text{abA}}$	$9,1 \pm 0,1^{\text{bA}}$	$9,2 \pm 0,1^{\text{bB}}$	$9,4 \pm 0,1^{\text{aA}}$	$9,3 \pm 0,1^{\text{abA}}$
	F.T	$8,6 \pm 0,1^{\text{cA}}$	$9,1 \pm 0,2^{\text{abcA}}$	$9,2 \pm 0,1^{\text{bA}}$	$9,4 \pm 0,1^{\text{abA}}$	$9,4 \pm 0,0^{\text{aA}}$	$9,3 \pm 0,0^{\text{abA}}$
ST-M6®	F.C	$8,0 \pm 0,2^{\text{bA}}$	$8,7 \pm 0,1^{\text{abA}}$	$8,6 \pm 0,1^{\text{abB}}$	$9,0 \pm 0,1^{\text{aA}}$	$9,0 \pm 0,2^{\text{aA}}$	$8,8 \pm 0,0^{\text{aA}}$
	F.T	$8,0 \pm 0,1^{\text{bA}}$	$8,7 \pm 0,1^{\text{aA}}$	$8,8 \pm 0,1^{\text{aA}}$	$8,8 \pm 0,2^{\text{aA}}$	$9,0 \pm 0,2^{\text{aA}}$	$8,8 \pm 0,2^{\text{aA}}$

FT.: Formulação Teste com 2,5% de subproduto de caju desidratado FC.: Formulação controle sem subproduto de caju desidratado; F19.: cepa probiótica de *Lacticaseibacillus paracasei* subsp. *paracasei* F19; ST-M6.: cepa *starter Streptococcus thermophilus* ST-M6. Letras minúsculas diferentes em uma mesma linha representam valores significativamente diferentes ($p < 0,05$). Letras maiúsculas diferentes em uma mesma coluna representam valores significativamente diferentes para a mesma cepa ($p < 0,01$).

A viabilidade de F-19® se manteve superior àquela de ST-M6® durante o período de armazenamento, com $9,3 \log \text{ UFC/ mL}$ no dia 28 para ambas as formulações. Isso pode estar relacionado ao maior inóculo inicial da cepa probiótica em relação à *starter*. Apesar disso as cepas *starter* tiveram uma tendência de aumento até dia 21, seguindo de decaimento no dia 28 em ambas as formulações. Valores estatisticamente diferentes foram encontrados durante vida de prateleira, porém a relevância microbiológica pode ser considerada em poucos cenários. Utilizando-se grau de significância de 95% as imprecisões inerentes ao processo metodológico tendem a prevalecer. Nesse caso a relevância microbiológica seria mais considerável quando diferenças iguais ou superiores a $0,5 \log \text{ UFC/mL}$ foram quantificados.

Em um estudo envolvendo formulações de diferentes iogurtes e leites fermentados, a viabilidade de *L. paracasei*, *L. acidophilus* e *S. thermophilus* tenderam a uma diminuição progressiva em até 27 dias de refrigeração (GU et al., 2021). Já em um estudo com iogurte adicionados de fibras de frutas, valores de viabilidade superiores a $9 \log \text{ UFC/ mL}$ foram observados a cepa *starter* em todas as formulações após 28 dias de refrigeração (ESPÍRITO SANTO et al., 2012a). O uso do suco de caju como veículo de *L. casei* apresentou quantidades sempre superiores a $8,0 \log \text{ UFC/ mL}$ durante 42 dias de refrigeração (PEREIRA; MACIEL;

RODRIGUES, 2011). Diferente do estudo aqui detalhado, iogurtes probióticos adicionados de até 2% de fibra de damasco apresentaram diminuição da viabilidade de *Lactobacillus acidophilus* LA-5 e *Bifidobacterium animalis* subsp *lactis* BB-12 s durante os 20 dias de armazenamento (KARACA et al., 2019). Reduções de aproximadamente 1,4 e 2,0 log UFC/mL foram quantificadas para as respectivas cepas.

A despeito da diversidade de resultados comparando-se com outros estudos, a viabilidade dos microrganismos probióticos no armazenamento refrigerado tanto de FC quanto em FT apresentaram-se aceitáveis. Instituições internacionais como a canadense e italiana consideram adequadas quantidades superiores a 9 log UFC/ porção dos probióticos mais tradicionais (*Lactobacillus* spp. ou *Bifidobacterium* spp.) para alegar benefício geral à melhoria da saúde da microbiota intestinal (HILL et al., 2014; SHORI, 2016).

O metabolismo ativo dos microrganismos presentes nos leites fermentados também implicou em acidificação durante o armazenamento dos mesmos (tabela 18), com valores significativamente crescentes para acidez e decrescentes para o pH durante o armazenamento ($p < 0,05$). Ao final de 28 dias a acidez livre (em g ácido láctico/ 100 mL) e pH foram respectivamente de 1,4 e 3,7 para F.T e de 1,5 e 3,8 para FC Essa tendência foi observada também no estudo de Karaca et al. (2019), em que a adição de 2% de subproduto de damasco em iogurte probiótico resultou em acidez titulável média de 1,25 no ao fim de 20 dias de refrigeração. Tanto no estudo citado como no aqui apresentado a adição de subproduto de fruta não foi significativa ($p > 0,05$) para a alteração do perfil de acidez e pH das amostras. Ainda assim, salienta-se que tanto o pH quanto a acidez titulável das duas formulações atenderam padrões nacionais e internacionais de qualidade para leites fermentados durante toda a vida de prateleira (FAO, 2003; BRASIL, 2007).

A relação de manutenção das cepas probióticas e *starter*, assim como a acidificação já foram constatados em outros estudos. Uma viabilidade média de 8 log UFC/ mL de *L. paracasei* não sofreu interferência negativa do aumento da acidez e diminuição de pH em sobremesas lácteas de chocolate (VALENCIA et al., 2016). Adicionalmente, um estudo com bebida com leite de cabra também não constatou interferência da adição de polpas de goiaba e graviola na viabilidade das cepas *starter* e probiótica (BURITI et al., 2014).

Tabela 18. Valores de pH e acidez titulável em leite fermentado com e sem adição de subproduto de caju durante manutenção por 28 dias em refrigeração.

Formulações		Dia 01	Dia 07	Dia 14	Dia 21	Dia 28
pH	FC	5,1 ± 0,01 ^{aA}	4,3 ± 0,04 ^{bA}	4,0 ± 0,02 ^{cA}	3,9 ± 0,01 ^{dA}	3,8 ± 0,03 ^{dA}
	FT	5,0 ± 0,04 ^{aA}	4,1 ± 0,03 ^{bB}	3,9 ± 0,01 ^{cA}	3,8 ± 0,01 ^{dA}	3,7 ± 0,05 ^{dA}
Acidez	FC	0,6 ± 0,01 ^{dA}	1,0 ± 0,02 ^{cA}	1,2 ± 0,01 ^{bB}	1,3 ± 0,02 ^{bA}	1,5 ± 0,02 ^{aA}
	FT	0,7 ± 0,03 ^{dA}	1,1 ± 0,01 ^{cA}	1,3 ± 0,02 ^{bA}	1,3 ± 0,03 ^{bA}	1,4 ± 0,02 ^{aA}

FT: Formulação Teste com 2,5% de subproduto de caju desidratado FC.: Formulação controle sem subproduto de caju desidratado; F19.: cepa probiótica de *Lacticaseibacillus paracasei* subsp. *paracasei* F19®; ST-M6®.: cepa starter *Streptococcus thermophilus* ST-M6. Letras minúsculas diferentes em uma mesma linha representam valores significativamente diferentes ($p < 0,05$). Letras maiúsculas diferentes em uma mesma coluna para mesmo parâmetro representam valores significativamente diferentes ($p < 0,05$).

7.4 Determinação da composição centesimal e funcional dos leites fermentados.

As formulações de leite fermentado com a adição das cepas *L. paracasei* F-19® e *S. thermophilus* ST-M6® tiveram sua composição centesimal determinada apenas no dia 1 de produção (tabela 19). Diversos substratos advindo de frutas, entre eles subprodutos, representam alternativas interessantes quanto ao seu valor nutricional propriamente dito ou mesmo ao serem aplicados em alimentos fermentados por bactérias lácticas (entre elas espécies de *Lacticaseibacillus*) (RODRIGUEZ et al., 2021).

A adição de subproduto de caju na formulação de leite fermentado (FT) resultou em diferenças quanto ao perfil centesimal das amostras. Como esperado, houve um incremento no teor de fibras totais e, principalmente, insolúveis, quando comparado com FC. Isso provavelmente resultou na diminuição significativa de umidade e aumento de valor calórico na formulação F.T ($p < 0,05$). Considerando-se a adaptabilidade das cepas utilizadas em ambas as formulações, pode-se esperar que o metabolismo enzimático microbiano atue nessa matriz adicionada, favorecendo a produção de novos compostos derivados com impacto no aroma e na funcionalidade durante a fermentação e armazenamento (RODRIGUEZ et al., 2021).

Tabela 19. Composição centesimal (média ± desvio padrão) dos leites fermentados FC (formulação controle) e FT (formulação com sub produto de caju).

Parâmetro	FC	FT
Umidade (g/ 100g)	80,57 ± 0,15 ^a	78,36 ± 0,27 ^b
Cinzas (g/ 100g)	0,79 ± 0,02 ^b	0,83 ± 0,01 ^a
Proteínas (g/ 100g)	3,69 ± 0,03 ^a	3,74 ± 0,30 ^a
Carboidratos (g/ 100g)	10,89 ± 0,15 ^a	11,18 ± 0,28 ^a
Gorduras totais (g/ 100g)	4,06 ± 0,03 ^a	4,11 ± 0,23 ^a
Fibra total (g/ 100g)	-	1,78
Fibra insolúvel (g/ 100g)	-	1,56
Fibra solúvel (g/ 100g)	-	0,22
Valor energético (kcal/ 100g)	149 ± 1,46 ^b	152 ± 1,76 ^a

Valor de carboidratos representa a porção disponível com exclusão das fibras adicionadas na presença do SC. Valores de fibra total, insolúvel e solúvel foram estimados na F.T com base na composição centesimal do S.C e o percentual de adição do mesmo (2,5%). Letras minúsculas diferentes em uma mesma linha representam valores significativamente diferentes ($p < 0,05$).

Outro ponto observado foi quanto à composição de ácidos graxos dos leites fermentados produzidos (tabela 20). De maneira geral, a diversidade observada foi característica de bases lácteas e sofreu pouca interferência da adição de subproduto de caju. Considerando-se a equatitividade de ingredientes lácteos para as formulações, ambas apresentaram predomínio de ácidos graxos saturados palmítico, mirístico e esteárico. Estudos realizados por Serafeimidou et al. (2012) e Gu et al. (2021) demonstraram representatividade equivalente para esses mesmos ácidos graxos em formulações de iogurtes usando leite. Associado a esses principais ácidos graxos comuns em bases lácteas, os ácidos caprílico e cáprico e lúrico foram encontrados e estão relacionados ao perfil de sabor. O perfil bioativo interessante para esses ácidos graxos como caprílico, cáprico e laurico tem demonstrado atividade antiviral e antibacteriana (GU et al., 2021).

Associado ao perfil natural de bases lácteas, elas podem ser alteradas pela introdução de ingredientes, como fibras de origem vegetal e até mesmo subprodutos de frutas. Estudo com iogurte fortificado demonstrou aumento proporcional de ácido linolênico em 12×, 19× e 32×, comparado à formulação controle, quando adicionado, respectivamente, com 1%, 3% e 5% de farinha de linhaça (MARAND et al., 2020).

Outro ponto importante de ser enaltecido é a possível interferência que o processo de fermentação teve na composição de ácido linoleico conjugado, com ênfase no ácido rumênico. Estudos tem investigado a capacidade de diversas espécies de gêneros como *Lactobacillus* spp., *Bifidobacterium* spp. e *Streptococcus thermophilus* de produzirem ácido linolênico conjugado (GHOLAMI; KHOSRAVI-DARANI, 2014). O perfil de ácidos graxos mono e polinsaturados

no presente trabalho também deve ser reforçado, uma vez que a presença de SC teve ligeiro impacto no incremento de ácido oleico e ácido linolênico (ambos identificados no SC). Juntos, o ácido rumênico e linolênico são compostos com atestada influência positiva na diminuição de risco de doenças cardiovasculares (MARAND et al., 2020).

Tabela 20. Composição de ácidos graxos das formulações de leites fermentado probiótico

Ácido graxo	FC μg/g	F.T μg/g
Ácido caprílico (C8:0)	13,8 ± 1,8 ^a	14,0 ± 0,7 ^a
Ácido cáprico (C10:0)	49,8 (36,3 – 76,7) ^a	50,1 (49,9 – 61,8) ^a
Ácido láurico (C12:0)	96,6 ± 18,5 ^a	90,1 ± 8,1 ^a
Ácido mirístico (C14:0)	363,4 ± 64,1 ^a	342,3 ± 26,8 ^a
Ácido miristoleico (C14:1)	30,2 ± 5,7 ^a	28,5 ± 2,5 ^a
Ácido pentadecanoico (C15:0)	40,8 ± 6,7 ^a	37,6 ± 3,0 ^a
Ácido palmítico (C16:0)	1449,0 ± 177 ^a	1341,0 ± 85,0 ^a
Ácido palmitoleico (C16:1)	45,8 ± 8,1 ^a	43,8 ± 3,3 ^a
Ácido margárico (C17:0)	19,5 ± 3,5 ^a	18,0 ± 1,3 ^a
Ácido margaricoleico (C17:1)	7,1 ± 0,8 ^a	5,4 ± 0,5 ^a
Ácido esteárico (C18:0)	691,1 ± 75,3 ^a	620,0 ± 38,0 ^a
Ácido oleico (C18:1)	643,0 ± 109 ^a	708,3 ± 61,0 ^a
Ácido linoleico (C18:2)	77,0 ± 13,9 ^a	77,0 ± 6,3 ^a
Ácido rumênico (C18:2)	8,4 ± 1,5 ^a	7,8 ± 1,0 ^a
Ácido linolênico (C18:3)	-	8,6 ± 0,9

FT: Formulação Teste com 2,5% de subproduto de caju desidratado FC.: Formulação controle sem subproduto de caju desidratado. Valores de média e erro padrão da média ou mediana e primeiro e terceiro quartis (ácido cáprico). O percentual (%) representa a contribuição de cada ácido graxo detectado no perfil total de lipídios identificados. Letras minúsculas diferentes representam diferenças significativas ($p < 0,05$) na mesma linha.

Valores de compostos fenólicos totais (CFT) identificados pelo ensaio do Folin-Ciocalteu demonstraram-se significativamente maiores ($p < 0,05$) para a formulação com adição de SC durante o armazenamento refrigerado. Por outro lado, um aumento significativo de CFT foi observado nos dias 14 e 28 da formulação FC (Tabela 21). É sabido que açúcares redutores e compostos capazes de doar H^+ podem interferir tanto no resultado do ensaio de CFT como de inativação do DPPH (HARNLY, 2017; PÉREZ-BURILLO; RUFIÁN-HENARES; PASTORIZA, 2018). Logo, o processo de acidificação (diminuição de pH e aumento de acidez) podem ter repercutido em valores maiores de CFT e DPPH para ambas as formulações. Porém, é inegável que, mesmo assim, a presença de SC teve impacto diferencial nesses parâmetros comparando-se as duas formulações ($p < 0,05$).

Quanto ao potencial antioxidante medido pela inibição do DPPH, foi observado uma direta proporcionalidade aos maiores valores de CFT. Apesar de leve oscilação no percentual de inibição para a FT no dia 14, todos os valores observados durante o armazenamento foram superiores a 66% e significativamente maiores ($p < 0,05$) aos do FC.

Tabela 21. Compostos fenólicos totais e atividade antioxidante das formulações de leite fermentados durante armazenamento refrigerado.

Parâmetro Formulação		D1	D14	D28
CFT	FC	1145,4 ± 26,1 ^{cB}	1669,8 ± 14,4 ^{bB}	1722,1 ± 12,1 ^{aB}
	FT	2250,5 ± 16,4 ^{aA}	2459,5 ± 72,1 ^{aA}	2441,2 ± 25,3 ^{aA}
DPPH IC ₅₀	FC	102,07 ± 3,2 ^{aA}	83,77 ± 2,8 ^{bA}	112,23 ± 4,0 ^{aA}
	FT	49,83 ± 2,0 ^{aB}	29,41 ± 1,0 ^{bB}	17,28 ± 0,6 ^{cB}
I. DPPH	FC	50,57 ± 0,4 ^{abB}	52,02 ± 0,5 ^{aB}	48,3 6± 0,2 ^{bB}
	FT	76,27 ± 1,4 ^{aA}	66,47 ± 0,9 ^{bA}	71,01 ± 0, ^{8abA}

FC.: Formulação controle sem subproduto de caju desidratado; FT: Formulação Teste com 2,5% de subproduto de caju desidratado. D1 D14 e D28 representam os dias de armazenamento em refrigeração. CFT: Compostos fenólicos totais representados em equivalente de ácido gálico por 100 g da formulação (mg EAG/ 100g). IC₅₀: concentração de extração obtida das formulações que consegue inibir 50% do DPPH em reação em mg/mL. I. DPPH.: percentual de inibição do DPPH em reação (%). Valores representados em média e erro padrão da média. Letras minúsculas diferentes em uma mesma linha representam valores significativamente diferentes ($p < 0,05$). Letras maiúsculas diferentes na mesma coluna entre formulações FC e FT representam valores significativamente diferentes ($p < 0,05$).

Na literatura, a investigação a respeito da dinâmica de potencial antioxidante em alimentos com adição de ingredientes naturalmente ricos em compostos fenólicos é diversa e dinâmica (BALASUNDRAM et al., 2006; BANERJEE et al., 20017). No presente trabalho, a adição de subproduto de caju repercutiu em melhores valores de atividade antioxidante com tendência de melhora no decorrer da vida de prateleira. Essa possível estabilidade oxidativa se deve muito provavelmente aos compostos fenólicos naturalmente presentes na fibra de caju associado ao metabolismo ativo dos microrganismos usados. De acordo com Quirós-Sauceda et al. (2014) o termo “fibra antioxidante” tem sido empregado para caracterizar “um concentrado de fibra dietética contendo quantidades significativas de antioxidantes naturais associados a compostos não digeríveis”.

A presença dos microrganismos presentes no leite fermentados também deve ser evidenciada. Esses, por sua vez, apresentaram-se viáveis e com metabolismo ativo durante toda a vida de prateleira estudada dos leites fermentados. Hipotetiza-se que a fermentação e consequente acidificação da base láctea, assim como a adição de matriz fibrosa do subproduto de caju podem ter agido de forma sinérgica, em que houve a formação e liberação de metabólitos com maior capacidade antioxidante.

Estudos já somam evidências de que o substrato complexo dos subprodutos da fruta é alvo para várias enzimas produzidas pelas bactérias autóctones ou alóctones (como as probióticas). Pode-se citar β -glicosidases (*Lactobacillus* spp., *Bifidobacterium* spp., *Bacteroides* spp.), tanases (*Bifidobacterium* spp., *Lactiplantibacillus plantarum* e *Akkermansia muciniphila*) e enzimas celulolíticas (espécies *Bacteroides* spp. e *Ruminococcus* spp.). Como consequência, há formação de flavonóides agliconados, despolimerização de fenólicos complexos e produção de ácidos graxos de cadeia curta ou mesmo de ácidos graxos poli-insaturados conjugados (BUSSOLO DE SOUZA et al., 2019; BUTTÓ; HALLER, 2016; LUCA et al., 2019; TOURIÑO et al., 2011; ROBERT; BERNALIER-DONADILLE, 2003). Adicionalmente, Ljungh; Lan; Yanagisawa (2002) relataram que a cepa de *Lacticaseibacillus* subsp. *paracasei* F-19[®], usada nas formulações de leite fermentado nesse estudo, apresentou capacidade de degradar fibras e produzir compostos antioxidantes.

Estudos já tem atestado que as principais formas fenólicas bioacessíveis são derivadas do metabolismo bacteriano (ácidos benzoicos, ácidos fenilpropiônicos, ácidos fenilacéticos, fenóis, ácidos hipúricos e outros) e que são estruturalmente diferentes das formas fenólicas presentes nos alimentos como flavonóides, monômeros de glicosídeos ou formas oligoméricas e poliméricas (MUÑOZ-GONZÁLEZ et al., 2013; OZDAL et al., 2016). Dessa forma, a presença da cepa F-19[®] pode ter agido positivamente para a melhora do perfil antioxidante durante a vida de prateleira do leite fermentado FT e isso representa um aspecto positivo para atender demandas por alimentos seguros e com uso de aditivos alimentares naturais.

7.5 Sobrevivência dos microrganismos em leites fermentado às condições gastrointestinais em modelo estático e dinâmico.

Os leites fermentados produzidos foram submetidos à avaliação da sobrevivência das cepas probiótica e *starter* após dinâmica simulada das condições gastrointestinais, com respectivos resultados apresentados nas tabelas 22, 23 e 24. Apenas para a cepa probiótica F-19[®], essa dinâmica de resistência foi avaliada tanto em modelo estático como dinâmico (SEMH[®]).

Na avaliação em modelo estático, em uma população sempre superior a 9,00 log UFC/mL de leite fermentado, foram observadas respostas variáveis na sobrevivência para os dias 7, 14 e 28 de armazenamento em refrigeração. Ênfase deve ser dada à resistência às condições gástricas, etapa com baixos valores de pH (2,0-2,5), em que populações sobreviventes superiores ($p < 0,05$) foram observados para FT em todos os dias avaliados. Também foram

detectados maiores populações de microrganismos sobreviventes ($p < 0,05$) para os dias 7 e 28 após a fase entérica II.

Por outro lado, durante as fases gástrica e entérica no SEMH®, maior sobrevivência de microrganismos ($p < 0,05$) foi constatada para o leite fermentado FC, após fase gástrica. Por outro lado, ao considerar a variação da fase gástrica para a entérica dessa cepa, pode-se constatar uma recuperação aproximada entre as formulações, com acréscimo de 1,26 log UFC/ mL e de 1,36 log UFC/ mL respectivamente para FC e FT ao fim da fase entérica.

Outro fator que pode ser elencado para explicar essa diferença entre os modelo estático e dinâmico pode estar associado com a técnica de cultivo usada para enumeração das cepas. Battistini et al. (2021) fizeram uso do mesmo modelo estático dessa tese, porém para enumeração dos microrganismos usaram técnicas de microbiologia molecular (qPCR). Os autores observaram uma maior sobrevivência (aproximadamente 6,0 log UFC/ Ml) após fase entérica II em leite fermentado probiótico com F-19® e enriquecido com subproduto de cevada. Considerando que a técnica de enumeração nessa tese utilizou metodologia de microbiologia básica em meio de cultura, ela pode não ter sido sensível suficiente para quantificar as células vivas porém injuriadas pelo processo de digestão, o que pode ter levado à subestimação das mesmas.

Tabela 22. Sobrevida (log UFC/ mL) durante as condições gastrointestinais simuladas no sistema *in vitro* estático de *Lacticaseibacillus paracasei* subsp. *paracasei* F-19® em leites fermentados com e sem subproduto de caju.

	Formulação	F0	FG	FE1	FE2
D7	FC	9,05 ± 0,01 ^{aB}	5,28 ± 0,23 ^{bD}	2,55 ± 0,06 ^{cB}	2,53 ± 0,08 ^{cC}
	FT	9,16 ± 0,08 ^{aAB}	8,21 ± 0,17 ^{bB}	3,15 ± 0,24 ^{dAB}	4,52 ± 0,05 ^{cB}
D14	FC	9,18 ± 0,01 ^{aAB}	5,20 ± 0,16 ^{bD}	3,67 ± 0,11 ^{cA}	3,93 ± 0,16 ^{cB}
	FT	9,42 ± 0,09 ^{aA}	9,26 ± 0,01 ^{aA}	3,66 ± 0,08 ^{dA}	4,43 ± 0,11 ^{cB}
D28	FC	9,26 ± 0,01 ^{aAB}	4,81 ± 0,09 ^{bD}	3,26 ± 0,11 ^{dA}	4,19 ± 0,13 ^{cB}
	FT	9,23 ± 0,07 ^{aAB}	6,55 ± 0,05 ^{bC}	3,59 ± 0,06 ^{dA}	4,65 ± 0,17 ^{cA}

FT.: Formulação Teste com 2,5% de subproduto de caju desidratado FC.: Formulação controle sem subproduto de caju desidratado; D7 D14 e D28 representam os dias de armazenamento em refrigeração. F0.: contagem da cepa no leite fermentado antes da simulação das condições gastrointestinais; F.G.: fase gástrica; F.E1.: fase entérica 1; FE2.: fase entérica 2. Letras minúsculas diferentes em mesma linha representam valores significativamente diferentes ($p < 0,05$). Letras maiúsculas diferentes em uma mesma coluna representam valores significativamente diferentes ($p < 0,05$).

Tabela 23. Sobrevivência (log UFC/ mL) de *Lacticaseibacillus paracasei* subsp. *paracasei* F-19® em leites fermentados com e sem subproduto de caju durante as condições gastrointestinais simuladas no sistema *in vitro* dinâmico SEMH®.

Formulação	F0	FG	FE
FC	9,44 ± 0,03 ^{aB}	5,78 ± 0,04 ^{cA}	7,04 ± 0,13 ^{bA}
FT	9,62 ± 0,06 ^{aA}	4,54 ± 0,08 ^{bB}	5,90 ± 0,06 ^{cB}

FT.: Formulação Teste com 2,5% de subproduto de caju desidratado FC.: Formulação controle sem subproduto de caju desidratado; F0.: contagem da cepa no leite fermentado antes da simulação das condições gastrointestinais; F.G.: fase gástrica em reator 1 no SEMH®; F.E.: fase entérica em reator 2 no SEMH®. Valores representam as médias quantificadas nas formulações no 14º dia de armazenamento refrigerado. Letras minúsculas diferentes em uma mesma linha representam valores significativamente diferentes ($p < 0,05$). Letras maiúsculas diferentes em uma mesma coluna representam valores significativamente diferentes ($p < 0,05$).

De forma complementar à investigação da cepa probiótica, também foi investigada a sobrevivência da cepa *S. thermophilus* ST-M6® em modelo estático (Tabela 24). Partindo-se de valores superiores a 8,50 log UFC/ mL de leite fermentado, pode-se observar uma tendência de diminuição progressiva da população do microrganismo após as fases gástrica e entérica I. Uma interferência positiva da presença do subproduto de caju foi constatada na recuperação de melhores valores ao final da fase entérica II. Nesse cenário, valores significativamente superiores ($p < 0,05$) comparados à fase entérica I foram observados em todos os dias para FT (e apenas no dia 7 para FC).

Tabela 24. Sobrevivência (log UFC/ mL) durante condições gastrointestinais simuladas no sistema *in vitro* estático de *Streptococcus thermophilus* ST-M6® em leites fermentados com e sem subproduto de caju.

Formulação	F0	FG	FE	FEE
D7	FC	8,70 ± 0,09 ^{aA}	5,01 ± 0,08 ^{bA}	2,54 ± 0,11 ^{dB}
	FT	8,81 ± 0,08 ^{aA}	5,14 ± 0,07 ^{bA}	2,75 ± 0,34 ^{cAB}
D14	FC	9,06 ± 0,11 ^{aA}	5,07 ± 0,15 ^{bA}	3,73 ± 0,08 ^{cA}
	FT	8,85 ± 0,22 ^{aA}	2,97 ± 0,20 ^{cB}	2,52 ± 0,18 ^{cB}
D28	FC	8,58 ± 0,31 ^{aA}	5,11 ± 0,21 ^{bA}	3,58 ± 0,17 ^{cA}
	FT	8,52 ± 0,28 ^{aA}	5,20 ± 0,16 ^{bA}	3,50 ± 0,06 ^{dA}
				4,49 ± 0,13 ^{cA}

FT.: Formulação Teste com 2,5% de subproduto de caju desidratado FC.: Formulação controle sem subproduto de caju desidratado; D7 D14 e D28 representam os dias de armazenamento em refrigeração. F0.: contagem da cepa no leite fermentado antes da simulação das condições gastrointestinais; F.G.: fase gástrica; F.E.: fase entérica 1; FEE.: fase entérica 2. Letras minúsculas diferentes em uma mesma linha representam valores significativamente diferentes ($p < 0,05$). Letras maiúsculas diferentes em uma mesma coluna representam valores significativamente diferentes ($p < 0,05$).

Fibras alimentares possuem, em sua constituição, uma dinâmica molecular com polissacarídeos com a co-existência de cadeias solúveis e insolúveis em meio aquoso. Isso já

foi evidenciado no subproduto SC, com a presença majoritária de fibras insolúveis (Tabela 6). Essas, por sua vez, já apresentaram sua microscopia estudada em estudo prévio realizado por Medeiros et al. (2019) com predominância de superfície irregular e porosa. O consumo desse tipo de fibra facilita a propagação bacteriana, em que a adesão da bactéria ao substrato desempenha um papel importante para sua sobrevivência e consequente efeitos na composição e metabolismo da microbiota intestinal(LI et al., 2021).

Estudo realizado por Vieira et al. (2021) desenvolveu uma bebida fermentada de soja com a co-cultura de *Bifidobacterium longum* BB-46®, *Lactobacillus acidophilus* LA-5® e *Streptococcus thermophilus* TH-4® enriquecida com subsproduto de acerola. Os autores avaliaram a sobrevivência das cepas às condições gastrointestinais simuladas no mesmo modelo estático usado nessa tese. Usando métodos de quantificação por qPCR foi observada uma melhor sobrevivência da BB-46® após fase gástrica, entérica I e II (superior a 5,5 log UFC/mL) durante todo o periodo de armazenamento. Para a cepa LA-5® por outro lado, a sobrevivência após fase gástrica, entérica I e II só foi maior até o dia 14 de armazenamento Aos 28 dias a sobrevivência foi inferior a 3,0 log UFC/ mL após todas as fases. Isso diferiu comparado ao quantificado nessa tese em que a sobrevivência da F-19® e ST-M6® foram superiores a 4,4 log UFC/ mL, em que a presença do subproduto de caju (SC) apresentou relevância estatística ($p < 0,05$) para uma maior sobrevivência da cepa probiótica comparado à formulação sem SC.

Pode-se sugerir que a presença de fibras alimentares conferiram um potencial interessante na sobrevivência de bactérias comensais ou benéficas durante condições gastrointestinais e melhoria da adesão ao epitélio intestinal (BEUKEMA; FAAS; DE VOS, 2020; LARSEN et al., 2018). Logo, a probabilidade de que um número aceitável de microrganismos alcancem e permanecerem viáveis no intestino grosso é maior, para assim atuarem positivamente dentro da homeostase da microbiota intestinal.

7.6 Contagem microbiológica, perfil de microbiota por qPCR em SEMH®

O SEMH® representa uma oportunidade para a investigação da dinâmica de microrganismos na microbiota intestinal. Com ele, foi possível avaliar diversos níveis taxonômicos bacterianos dentro da simulação de um ambiente intraluminal mais ou menos eubiótico. Duas metodologias foram utilizadas para quantificar alguns grupos bacterianos, a clássica de enumeração em meio de cultura por *drop-plate* e a mais recente com uso de biologia molecular (qPCR com tratamento prévio com PMA). Na Tabela 25 e 26 pode-se observar as mudanças ocorridas nos Experimento 1 e 2, em que houve, respectivamente, tratamento com FC (+F-19®/ +ST-M6®/ -SC) e FT (+F-19®/ +ST-M6®/ +SC). Os resultados apresentam-se em

valor absoluto quantificado e na variação de aumento ou diminuição do grupo bacteriano em relação à fase anterior

Tabela 25. Quantificação de grupos microbianos (log UFC/mL) por método de plaqueamento após uso de leite fermentado probiótico sem SC no SEMH® (Experimento 1).

Fases SEMH® / Parâmetros avaliados	F3- Controle 1	Tratamento com FC	Washout 1
Aeróbios totais e facultativos	8,37±0,07 ^a	8,57±0,11 ^a (↑2%)	7,74±0,07 ^b (↓10%)
<i>Lactobacillus</i> spp.	8,16 ± 0,06 ^b	8,72 ± 0,09 ^a (↑7%)	7,90 ± 0,06 ^c (↓9%)
<i>Bifidobacterium</i> spp.	8,15 ± 0,05 ^b	8,50 ± 0,12 ^a (↑4%)	8,09 ± 0,05 ^b (↓5%)
<i>Clostridium</i> spp.	8,43 ± 0,05 ^a	8,62 ± 0,12 ^a (↑2%)	8,10 ± 0,05 ^b (↓6%)

SC: subproduto de caju desidratado. FC: formulação de leite fermentado com probiótico sem SC. Valores representam média ± erro padrão da média. F3: Fase controle 1 com adição de meio carboidrato e suco pancreático. Valores entre parênteses nas colunas representam o percentual delta (Δ) de aumento (↑) ou diminuição (↓) da contagem bacteriana em relação à fase anterior. Letras minúsculas diferentes em uma mesma linha representam valores significativamente diferentes para Tukey ou Games-Howell ($p < 0,01$).

Tabela 26 - Quantificação de grupos microbianos (log UFC/mL) por método de plaqueamento após uso de leite fermentado probiótico com SC no SEMH® (Experimento 2).

Fases SEMH® / Parâmetros avaliados	F5 – Controle 2	Tratamento com FT	Washout 2
Aeróbios totais e facultativos	7,74±0,07 ^b	8,74±0,15 ^a (↑13%)	7,72±0,12 ^b (↓12%)
<i>Lactobacillus</i> spp.	7,90 ± 0,06 ^b	8,87 ± 0,14 ^a (↑12%)	7,71 ± 0,10 ^b (↓13%)
<i>Bifidobacterium</i> spp.	8,09 ± 0,05 ^b	8,60 ± 0,13 ^a (↑6%)	7,61 ± 0,07 ^c (↓12%)
<i>Clostridium</i> spp.	8,10 ± 0,05 ^b	8,87 ± 0,11 ^a (↑10%)	8,14 ± 0,11 ^b (↓8%)

SC: subproduto de caju desidratado. FT: formulação de leite fermentado com probiótico e 2,5% SC. Valores representam média ± erro padrão da média. F5: fase washout 1 considerada fase controle 2. Valores entre parênteses nas colunas representam o percentual delta (Δ) do aumento (↑) ou diminuição (↓) da contagem bacteriana em relação à fase anterior. Letras minúsculas diferentes em uma mesma linha representam valores significativamente diferentes para Tukey ou Games-Howell ($p < 0,01$).

Pode-se observar que apenas o tratamento com FT interferiu significativamente ($p < 0,01$) na população de Aeróbios Totais e *Clostridium* spp; com acréscimo de 1,0 log e 0,77 log UFC/mL respectivamente. Por outro lado tanto tratamento com FT quanto com FC aumentaram significativamente ($p < 0,01$) as populações de *Lactobacillus* spp. e *Bifidobacterium* spp. nas suas respectivas fases experimentais. Isso foi quantitativamente mais evidente para a formulação FT com acréscimo de população de *Lactobacillus* spp com maior relevância microbiológica próximo a 1,0 log UFC.

Também pode-se constatar que tanto após término dos tratamentos com FC ou FT (Washout 1 e Washout 2) houve redução significativa ($p < 0,01$) de todos os grupos bacterianos

comparado a fase anterior. Para *Lactobacillus* spp., por exemplo, (gênero da cepa probiótica utilizadas nas duas formulações) houve redução de 1,16 log e 0,82 log UFC/mL para as FT e FC respectivamente. Sugere-se preliminarmente, uma baixa resiliência na manutenção das alterações causadas pela alimentação do SEMH® com as formulações, e isso foi mais evidenciado para FT (+F-19®/ +ST-M6®/ +SC).

Para a compreensão mais aprofundada dos grupos bacterianos, também foi realizada a quantificação com o uso qPCR e com a exclusão de células mortas pelo uso do agente intercalante PMA (Tabelas 27 e 28). De maneira geral esse diferencial metodológico foi mais sensível para quantificar um maior número de células equivalente (NCE) quando comparado com o plaqueamento em meio de cultura por *drop-plate*.

Tabela 27. Grupos bacterianos antes, durante e após alimentação do SEMH® com leite fermentado probiótico sem subproduto de caju (Experimento 1).

Fases SEMH® / Parâmetros avaliados	F3 – Controle 1	Tratamento com FC)	Washout 1
<i>L. paracasei</i> F-19®	4,41 ± 0,05 ^c	7,71 ± 0,27 ^a (↑75%)	6,28 ± 0,17 ^b (↓19%)
<i>Lactobacillus</i> spp.	7,05 ± 0,01 ^c	9,08 ± 0,29 ^a (↑29%)	7,60 ± 0,04 ^b (↓16%)
<i>Bifidobacterium</i> spp.	10,68 ± 0,05 ^b	11,66 ± 0,03 ^a (↑9%)	10,25 ± 0,11 ^c (↓12%)
<i>Streptococcus</i> spp.	8,77 ± 0,01 ^a	8,91 ± 0,11 ^a (↑2%)	8,16 ± 0,05 ^b (↓8%)
<i>Clostridium</i> cluster I	10,40 ± 0,09 ^a	8,20 ± 0,09 ^b (↓21%)	8,35 ± 0,15 ^b (↑ 2%)
Firmicutes	9,34 ± 0,01 ^a	9,64 ± 0,13 ^a (↑3%)	8,37 ± 0,08 ^b (↓13%)
Bacteroidetes	8,89 ± 0,02 ^b	9,14 ± 0,13 ^b (↑3%)	9,60 ± 0,08 ^a (↑5%)
Actinobacteria	11,45 ± 0,22 ^b	13,85 ± 0,05 ^a (↑21%)	12,45 ± 0,41 ^{ab} (↓10%)
γ-Proteobacteria	12,02 ± 0,14 ^a	10,57± 0,10 ^b (↓12%)	11,94 ± 0,20 ^a (↑13%)

Valores quantificados por qPCR com pré-tratamento com PMA e expressos em log de Número de Células Equivalentes/ mL (logNCE/mL). SC: subproduto de caju desidratado. FC: formulação de leite fermentado com probiótico sem SC. Valores representam média e erro padrão da média. Valores entre parênteses representam o percentual delta (Δ) do aumento (↑) ou diminuição (↓) da contagem bacteriana em relação à fase anterior. F3: Fase controle 1 com adição de meio carboidrato e suco pancreático. Letras minúsculas diferentes em uma mesma linha representam valores significativamente diferentes para Tukey ou Games-Howell ($p < 0,01$).

Tabela 28 - Grupos bacterianos antes, durante e após alimentação do SEMH® com leite fermentado probiótico com subproduto de caju (Experimento 2).

Fases SEMH® / Parâmetros avaliados	F5 – Controle 2	Tratamento com FT	Washout 2
<i>L. paracasei</i> F-19®	6,28 ± 0,17 ^b	8,92 ± 0,18 ^a (↑ 42%)	6,55 ± 0,19 ^b (↓ 27%)
<i>Lactobacillus</i> spp.	7,60 ± 0,04 ^b	9,34 ± 0,07 ^a (↑ 23%)	7,53 ± 0,04 ^b (↓ 19%)
<i>Bifidobacterium</i> spp.	10,25 ± 0,11 ^b	11,00 ± 0,02 ^a (↑ 7%)	10,31 ± 0,07 ^b (↓ 6%)
<i>Streptococcus</i> spp.	8,16 ± 0,05 ^b	8,93 ± 0,05 ^a (↑ 9%)	7,56 ± 0,02 ^c (↓ 15%)
<i>Clostridium</i> cluster I	8,35 ± 0,15 ^a	6,86 ± 0,24 ^b (↓ 18%)	7,49 ± 0,02 ^c (↑ 9%)
Firmicutes	8,37 ± 0,08 ^b	9,35 ± 0,22 ^a (↑ 12%)	8,05 ± 0,02 ^c (↓ 14%)
Bacteroidetes	9,60 ± 0,08 ^a	8,29 ± 0,12 ^b (↓ 14%)	7,74 ± 0,04 ^c (↓ 7%)
Actinobacteria	12,45 ± 0,41 ^b	15,24 ± 0,11 ^a (↑ 22%)	12,66 ± 0,25 ^b (↓ 17%)
γ- Proteobacteria	11,94 ± 0,20 ^a	11,61 ± 0,13 ^a (↓ 3%)	8,51 ± 0,19 ^b (↓ 30%)

Valores quantificados por qPCR com pré-tratamento com PMA e expressos em log de Número de Células Equivalentes/ mL (log NCE/ mL). SC: subproduto de caju desidratado. FT: formulação de leite fermentado com probiótico com SC. Valores representam média e erro padrão da média. F5: fase washout 1 considerada fase controle 2. Valores entre parênteses nas colunas representam o percentual delta (Δ) do aumento (↑) ou diminuição (↓) da contagem bacteriana em relação à fase anterior. Letras minúsculas diferentes em uma mesma linha representam valores significativamente diferentes para Tukey ou Games-Howell ($p < 0,01$).

Comparado aos controles dos respectivos experimentos o tratamento FC e FT aumentou significativamente ($p < 0,01$) a população de F-19®, *Lactobacillus* spp., *Bifidobacterium* spp. e filo Actinobacteria dentro do conteúdo dos reatores do SEMH®. O inverso foi aferido para *Clostridium* cluster I durante a alimentação com FC e FT, em que valores inferiores aos controles foram aferidos ($p < 0,01$). Por outro lado somente durante tratamento com FC houve redução significativa de γ- Proteobacteria. No experimento 2 o tratamento com FT apenas manteve os valores baixos de γ- Proteobacteria alcançados ao final do experimento 1. Por outro lado depois do tratamento com FT, no Whasout 2, uma redução singificativca desse filo ($> 3,0$ log NCE) foi quantificada.

O microbioma humano apresenta um aparato de grande diversidade genética, com capacidade alterar a fisiopatologia de doenças, além de se relacionar também com a imunidade inata e influenciar o metabolismo e interações medicamentosas. Os microrganismos que o constituem, como por exemplo *Lactobacillus* spp e *Bifidobacterium* spp, são conhecidos por seus efeitos probióticos potenciais na prevenção e tratamento de certas doenças (Wang et al., 2017). Considerando isso, o efeito de ambas as formulações de leite fermentado com e sem subproduto de caju no aumento desses gêneros bacterianos deve ser ressaltado em prol de uma microbiota mais saudável.

Em outro estudo em modelo animal, os autores usaram 20% de subproduto de maçã 20% na formulação da dieta hiperlipídica e observaram atividade bifidogênica associada ao aumento

do colesterol HDL e diminuição dos efeitos da trigliceridemia e remodelagem da microbiota intestinal em modelos animais (Mateos-Aparicio et al. 2020). Duque et al. (2021) usando o mesmo modelo de simulação da fermentação colônica dessa tese observou aumento progressivo da abundância relativa de *Lactobacillus* spp e *Bifidobacterium* spp em até 72 h de tratamento com *Limosilactobacillus reuteri*, *Bifidobacterium longum* e GOS.

Adicionalmente, as alterações que as formulações FT e FC propiciaram no filo Actinobacteria representam algo positivo. Apesar de proporcionalmente menos abundante dentro da composição da microbiota intestinal, esse filo tem demonstrado protagonismo em processos metabólicos associados à eubiose intestinal em que o gênero *Bifidobacterium* spp é o representante principal (HOFFMANN et al., 2017; SHEN, 2013; RINNINELA et al., 2019). A presença de fibras do subproduto de caju provavelmente representou um fator positivo para a multiplicação de espécies de Actinobacteria. Sabe-se que esses microrganismos possuem aparato enzimático necessário para degradar carboidratos complexos de origem vegetal como FOS, GOS, XOS, inulina ou arabinoxilano (BINDA et al., 2018).

Como observado, os valores iniciais altos de *Clostridium* cluster I foram bastante impactados pelos tratamentos com os leite fermentados. Tal influência estendeu-se às semanas de washout 1 e 2, em que houve um o ligeiro aumento desse clustes, mas não foi suficiente para superar à diminuição causada pela alimentação de FC e FT. Esse cluster é notamente conhecido por espécies patogênicas como *Clostridium perfringens*, *C. tetani*, *C. chauvoei* e *C. botulinum* em que estudo com extratos fenólicos de subproduto de uva também atestaram uma diminuição significativa dele modelo animal (DOHRMAN et al., 2015; CHACAR et al., 2018)

Apesar de atualmente, não existir um consenso sobre uma padronização a nível taxonômico do que seria uma microbiota intestinal saudável, muitos estudos investigam aspectos relacionados a diferentes enterotipos, como os associando-se a razão Firmicutes : Bacteroidetes e baixa abundância de Proteobacteria (HOLLISTER et al., 2014). A razão desses filos tem sido investigada em algumas doenças crônicas, em que a maior proporcionalidade de Firmicutes para Bacteroidetes estaria relacionada a um excesso de gordura corporal (BALAN et al., 2020; FINUCANE et al., 2014; LEY, 2010).

Considerando isso, o tratamento com FC teve um impacto interessante no experimento 1. Durante e após a sua administração, no Washout 1 uma redução de Firmicutes e aumento de Bacteroidetes foi observada. Porém com início do experimento 2, a administração do FT aumentou ambos os filos. Apesar da presença de subproduto ter sido aparentemente desvantajosa nesse cenário, outros estudos com subprodutos de cranberry e café tem observado uma manutenção ou diminuição da razão Firmicutes e Bacteroidetes em modelos animais com

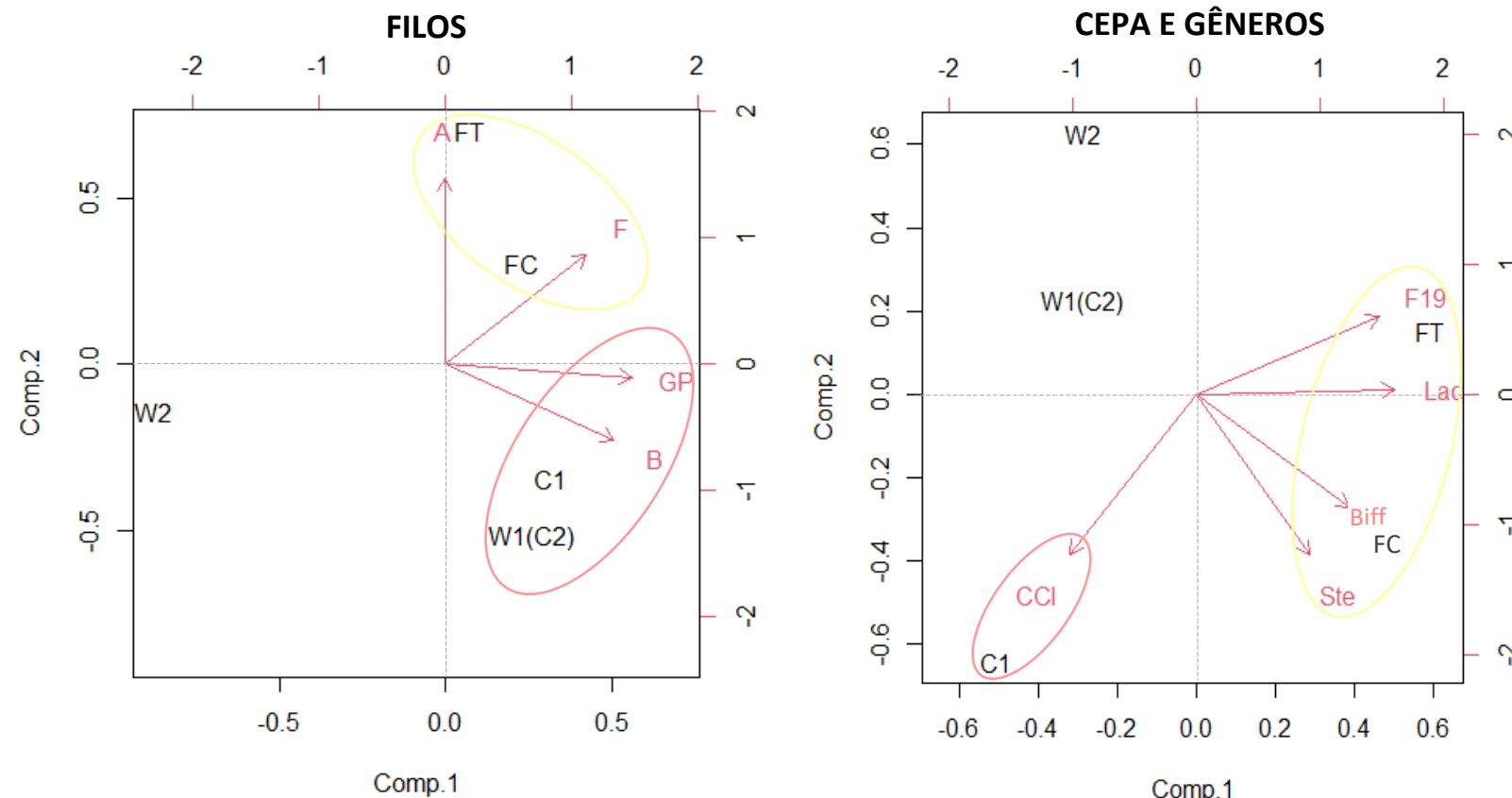
síndrome metabólica ou alimentados por dieta hiperlipídica e de alto índice glicêmico (ANHÊ ET AL., 2015; BHANDARKAR ET AL., 2019).

Considerando os desfechos com uso das duas formulações, é inegável que o consumo de ambas estão alinhados com pesquisas mais recentes que investigam a capacidade de alimentos em modular a dinâmica taxonômica da microbiota intestinal, em que os alimentos funcionais são evidenciados na prevenção ou diminuição de risco de doenças relacionadas à disbiose intestinal (DOMÍNGUEZ-DÍAZ; FERNÁNDEZ-RUIZ; CÁMARA, 2020; FARAG ET AL., 2020).

Os prebióticos e compostos bioativos em alimentos podem interagir com microrganismos comensais que habitam no trato gastrointestinal humano (GIBSON et al., 2017). O consumo dos microrganismos propriamente ditos, que apresentam efeito benéfico quando administrados em quantidades adequadas, fundamentam a associação sinérgica de ingredientes com potencialidade funcional (HILL et al., 2014). Os probióticos podem agir de maneira diversa para a melhoria da saúde humana, incluindo a produção de metabólitos com ação bacteriostática, inibição competitiva direta por nutrientes, capacidade de adesão, entre outras ações que podem repercutir ou não em imunomodulação, melhoria da integridade da mucosa intestinal e produção de neurotransmissores. Essas ações podem ser melhoradas pela inclusão de substratos seletivamente utilizados pelo microrganismo alóctone co-administrado.

Outra forma de avaliar as mudanças na composição da microbiota intestinal no SEMH foi com avaliação da variância dos dados de em análises de componente principal (PCA) com os valores dos dois experimentos associados. A figura 5 apresenta duas PCA, uma para avaliação dos filos; e outra para avaliação da cepa F-19® e gêneros. Ambas apresentaram mais de 80% para explicação da variância dos dados em duas componentes.

Figura 5 – Análise de componentes principais dos filos, gêneros e espécies bacterianas durante fases e experimentos no SEMH®.



Componente 1 e 2 somam 83% na explicação da variância dos dados da PCA de filos e 96% na explicação para espécie e gêneros. C1: Controle 1. FC: Fase de introdução da formulação de leite fermentado probiótico sem subproduto de caju. W1(C2): Fase de washout 1 para o primeiro experimento e de controle 2 (C2) para segundo. FT: Fase de introdução da formulação de leite fermentado probiótico com 2,5% de subproduto de caju. W2: Washout 2. F19: *L. paracasei* F-19®. Lac: *Lactobacillus* spp. Biff: *Bifidobacterium* spp. Ste: *Streptococcus* spp. CCI: *Clostridium* cluster I. F: Firmicutes. B: Bacteroidetes. A: Actinobacteria. GP: γ -proteobacteria.

Avaliando as componentes de cada um dos dois gráficos, pode observar que uma maior estimativa de GP (γ -Proteobacteria) foi observada na primeira componente e foi bem correlacionada com o C1 e C2(W1). Para B (Bacteroidetes) a primeira componente também apresentou maior estimativa correlacionada a essas fases do tratamento. Para o gênero CCI (*Clostridium cluster I*) a segunda componente apresentou maior estimativa correlacionada com o C1. Isso evidencia uma maior contribuição de filos associados à disbiose intestinal, seja antes dos tratamento ou mesmo após (*washout 1*). Por outro lado também evidencia uma maior representatividade de Bacteroidetes, no controle do segundo experimento e *washout* do primeiro.

Para Firmicutes e Actinobacteria pode-se observar na segunda componente uma maior estimativa desses filos, com correlação significativa para ambos os tratamentos (porém com protagonismo maior no tratamento com FT). Para os gêneros e cepa a primeira componente apresentou alta estimativa para *Lactobacillus* spp e para a cepa F-19[®], assim como foi bem associada com a segunda componente para *Bifidobacterium* spp e *Streptococcus* spp. Todos esses grupos bacterianos apresentaram boa correlação com os tratamentos com e sem fibra de caju. Essa possibilidade de avaliar os dados summarizados dos dois experimentos em PCAs em comum permite entender que mesmo sendo experimentos independentes, a dispersão da amplitude dos dados parece ter se somado de forma positiva para maiores valores de filo, gênero e espécie, que por sua vez foram mais bem correlacionados com o tratamento FT quando seguido do FC.

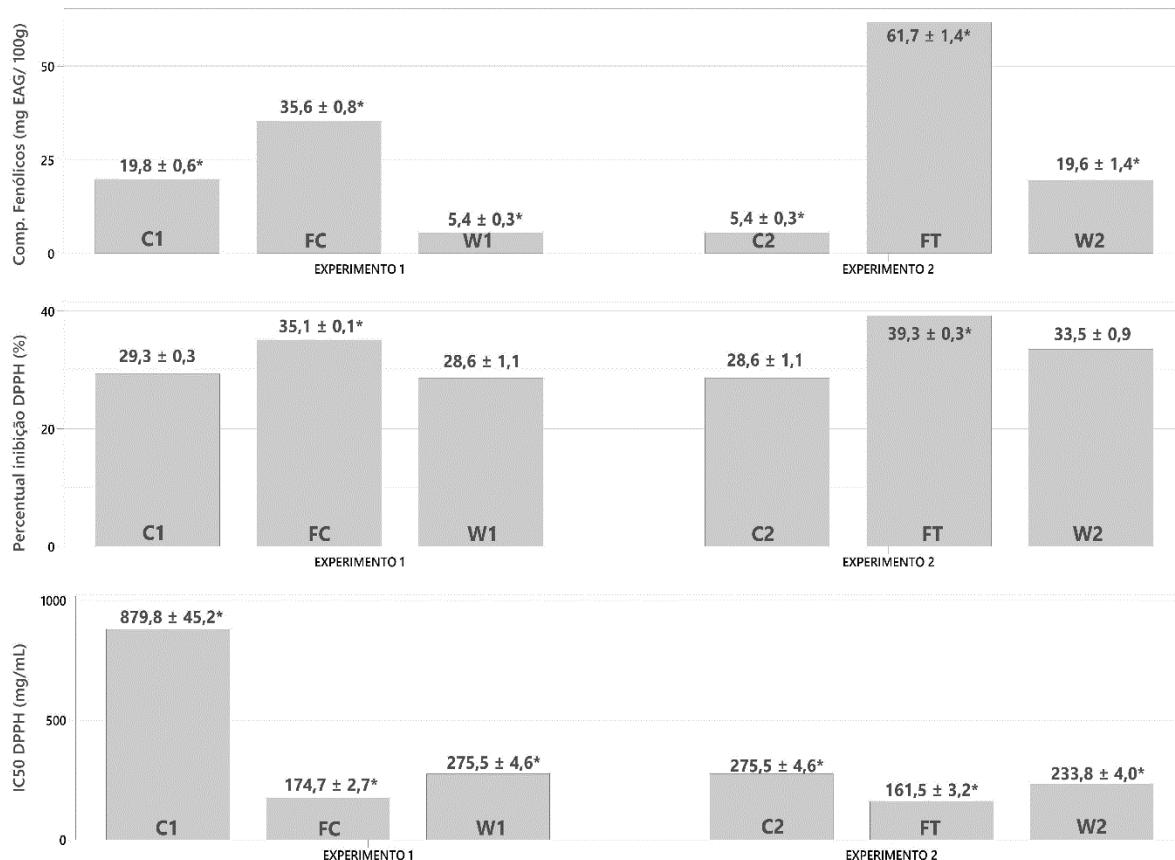
Em contrapartida, o controle 2 e *washout 1* e *2* apresentaram-se com baixa correlação às estimativas para todos os filos, gêneros e espécie. Isso denota, de acordo com as variâncias nas PCAs, que o tratamento com os tratamentos FC e FT foi pouco resiliente em manter as alterações dos grupos de microrganismos, seja para aqueles relacionados com benefícios à saúde (Lac, Biff, A, F e F-19[®]), seja para aqueles relacionados à disbiose intestinal (GP e CCI) (RIZZATI et al., 2017; SHIN; WHON; BAE, 2015).

A associação dos tratamentos dentro do SEMH[®] evidenciou alterações taxonômica importantes e que se associam com as premissas básicas sobre alimentos funcionais. O uso desse tipo de alimentos prevê uma regularidade de consumo associada a hábitos saudáveis de vida.

7.7 Compostos fenólicos, atividade antioxidante e perfil de ácidos graxos em SEMH®

Como observado, a relação taxonômica da microbiota investigada parece estar ligada com a presença do subproduto de caju rico em fibras alimentares e compostos bioativos. Nesse sentido, a investigação quanto à presença de compostos fenólicos, atividade antioxidante e perfil de ácidos graxos nas diferentes fases do SEMH® estão demonstradas na figura 6 e tabela 29.

Figura 6 – Composição de fenólicos totais e capacidade antioxidante ao radical DPPH dos experimentos no SEMH®.



SEMH: Simulador do Ecossistema Microbiano Humano. C1: Controle 1 (pós-padronização inóculo fecal). FC: adição de leite fermentado sem subproduto de caju desidratado. W1: Washout 1. C2: Controle 2 (Washout 1). FT: adição de leite fermentado com subproduto de caju desidratado. W2: Washout 2. Valores apresentados em média e erro padrão da média. Valores com presença de asterisco (*) são significativamente diferentes ($p < 0,01$) em relação aos demais para mesmo experimento (1 ou 2).

O tratamento com FT (com subproduto de caju) impactou positivamente e de forma significativa ($p < 0,01$) quanto aos compostos fenólicos totais (CFT) e atividade antioxidante no experimento 2. Por outro lado, a presença unicamente das cepas F-19® e ST-M6® no

tratamento com FC no experimento 1 também propiciou aumento ($p < 0,01$) para CFT e atividade antioxidante. Porém após encerrado o tratamento com FC (Washout1 e Controle 2) os valores tenderam a reduzir grandemente para CFT e essa diminuição também foi observada na capacidade antioxidante (seja na diminuição de percentual de inibição como no aumento IC₅₀ do DPPH·).

O perfil de microbiota com aumento de Actinobacteria nos tratamentos com FC e principalmente FT se relaciona com a capacidade desse grupo bacteriano em ser degradador de fibras, liberando íons hidrogênio, dióxido de carbono e Ácidos Graxos de Cadeia Curta (AGCC) (BINDA et al., 2018). Provavelmente a liberação de ácidos orgânicos e AGCC no tratamento FC teve impacto nos resultados de CFT, em que a análise com uso da metodologia com Folin-Ciocalteu pode ter sofrido interferência desses compostos (HARNLY, 2017; PÉREZ-BURILLO; RUFIÁN-HENARES; PASTORIZA, 2018).

Mesmo com essa interferência metodológica, é inegável que a presença do substrato de subproduto de caju parece ter influenciado em um melhor perfil de compostos bioativos e isso pode estar associados à modulação da microbiota intestinal com posterior benefícios à saúde do hospedeiro. Touriño et al. (2011) relataram que a despolimerização fermentativa de oligômeros de proantocianidinas de extratos de uva desencadeou ação antiproliferativa, sugerindo um efeito protetor na mucosa do intestino grosso. Zhang et al. (2018) constataram multiplicação seletiva de *Akkermansia muciniphila* e supressão de microrganismos competidores na população microbiana intestinal após a utilização de proantocianidinas e outros extratos polifenólicos de subprodutos da uva em camundongos alimentados com dietas hiperlipídicas.

Além do reforço positivo em bioativos, a dieta também pode fornecer constituintes pró-oxidantes, como nitritos, ferro heme, cobre, aldeídos e colesterol oxidado. Esses exemplos podem ser combinados com outros para culminarem no acúmulo de espécies reativas de oxigênio (EROs), capazes de causar lesões na mucosa do trato gastrointestinal (TERRA et al., 2017). Dessa forma a presença de compostos bioativos naturais, como os compostos fenólicos no leite fermentado FT, poderiam atuar como alimentos funcionais na redução EROS. Esses compostos associados aos probióticos podem interagir de forma eficiente, com proteínas, DNA e outras moléculas para produzirem resultados desejados, auxiliando na manutenção da permeabilidade da mucosa intestinal e mediando processos inflamatórios (CORY et al., 2018).

Dessa maneira, pode-se sugerir que a mudança de perfil de microbiota quantificado por qPCR pode se associar, de forma sinérgica, com os resultados de compostos bioativa quantificados pelos CFT e DPPH. O aumento significativo ($p < 0,01$), principalmente de Actinobacteria e F-19[®] (capazes de degradar fibras antioxidantes) no tratamento com FT pode

ter influenciado positivamente na presença de compostos antioxidantes fenólicos, seja durante ou mesmo após a utilização da formulação (*washout 2*) (DI CERBO; PALMIERI, 2013; BINDA et al., 2018).

Adicionalmente à presença dos compostos fenólicos, a dinâmica antioxidante pode ter sido incrementada pela presença de ácidos graxos poli-insaturados, como os ácidos linolênico e rumênico, quantificados apenas no tratamento com FT (tabela 29). Nessa tabela é apresentado o conteúdo de ácidos graxos presente nas formulações e nos respectivos conteúdos dos reatores durante antes (C1) e durante tratamento FC e FT.

Tabela 29. Composição de ácidos graxos das formulações de leite fermentado FC e FT e dos líquidos dos reatores durante as fases do experimento no SEMH®.

Ácido graxo (g/100g de lípides extraídos)	Controle	Tratamento com FC		Tratamento com FT	
	Conteúdo do reator	FC	Conteúdo do reator	FT	Conteúdo do reator
Ácido caprílico (C8:0)	N.I.	0,28	N.I.	0,41	N.I.
Ácido cáprico (C10:0)	N.I.	1,53	0,92	1,59	0,88
Ácido láurico (C12:0)	0,45	2,73	2,06	2,66	2,16
Ácido mirístico (C14:0)	2,37	10,27	7,15	10,07	8,93
Ácido miristoleico (C14:1)	N.I.	0,85	0,69	0,84	0,79
Ácido pentadecanoico (C15:0)	0,58	1,15	1,03	1,11	1,11
Ácido palmítico (C16:0)	40,49	40,96	45,86	39,44	42,82
Ácido palmitoleico (C16:1)	1,70	1,29	1,28	1,29	1,21
Ácido margárico (C17:0)	0,79	0,55	0,65	0,53	0,76
Ácido esteárico (C18:0)	32,84	19,53	25,27	18,22	20,48
Ácido oleico (C18:1)	14,60	18,16	14,11	20,83	17,90
Ácido linoleico (C18:2)	1,95	2,18	2,48	2,26	2,18
Ácido rumênico (C18:2)	N.I.	0,24	N.I.	0,23	0,22
Ácido linolênico (C18:3)	N.I.	N.I.	N.I.	0,25	0,27
Ácido eicosanoico (C20:0)	0,52	0,15	0,20	0,11	0,15

Controle representa os valores obtidos da Fase 3, pós-padronização inóculo fecal. FC: leite fermentado sem subproduto de caju desidratado. FT: leite fermentado com subproduto de caju desidratado. N.I.: não identificado.

Mesmo que ainda não tenha sido investigados, a proporção de AGCC nos tratamentos deve ser esperada como alta para lactato, propionato, acetato e butirato devido ao aumento de *Actinobacteria* e *Bifidobacterium* spp propiciado pelo tratamento com FC e FT (BINDA et al., 2018; MORRISON; PRESTON, 2016). Outros estudos com subprodutos avaliaram os AGCC e os relacionaram com grupos bacterianos. Gil-Sánchez et al. (2018) observaram que a suplementação com um extrato polifenólico de subprodutos da uva esteve positivamente correlacionado com os AGCC, com ênfase na concentração de propionato nas fezes e a

população de *Bifidobacterium* spp. após 21 dias da intervenção. Os AGCCs podem melhorar a resposta imune pela inibição da proliferação de linfócitos e ativação de células dendríticas (Cavaglieri et al. 2003; Singh et al. 2014). Esses dados atestam a ação indireta de polifenóis na microbiota intestinal para produzir outros metabólitos como AGCC.

Em termos de composição de ácidos graxos, a presença de alguns deles em maiores quantidades nas formulações, como o ácido cáprico, láurico, mirístico, miristoleico para FC e FT e oleico, rumênico e linolênico na FT tiveram impacto na composição dos reatores, uma vez que foram detectados em maiores quantidades em seus respectivos tratamentos em detrimento ao controle. A presença desses ácidos graxos nos experimentos pode ter efeitos dietéticos positivos. Estudo demonstraram que o ácido cáprico (C10:0) pode proteger contra a inflamação intestinal induzida, estresse oxidativo e melhora da função de barreira intestinal em modelos animais (LEE; KANG, 2018). Ácido linoleico conjugado, como o rumênico encontrado no tratamento FT tem sido relacionado a efeitos benéficos na prevenção e tratamento de doenças como câncer, obesidade e diabetes (FUKE; NORNBERG, 2017).

A principal contribuição de ácidos graxos advindo dos tratamentos está para o ácido graxo saturado palmítico (C16:0) comumente encontrado em matrizes lácteas. Relacionado à presença desse ácido graxo, estudo em modelo animal identificou que dietas ricas em gordura láctea (com predominância de C16:0) resultou em diminuição da abundância de Firmicutes e aumento da de Bacteroidetes (DEVKOTA et al., 2013). Essa mesma tendência foi observada durante e após tratamento com FC, que apresenta maior constituição de C16:0 na formulação e dentro dos reatores durante o tratamento.

Esses dados conferem valor positivo aos achados nos experimentos, pois a composição de ácidos graxos tem impacto no valor nutricional e na qualidade dos alimentos, e isso por sua vez afeta a estrutura, o metabolismo e a funcionalidade das células, influenciando assim a fisiologia e o estado de saúde dos seres vivos. Nesse quesito, apesar das evidências ainda preliminares, porém cada vez mais consistentes, a literatura descreve que ácidos graxos polinsaturados e monoinsaturados estariam mais associados a um perfil de microbiota intestinal mais saudável em condições de eutrofia (COSTANTINI et al., 2022). Pode-se supor que a formulação FT e sua aplicação no SEMH® seria mais vantajosa para a microbiota intestinal pela constituição de ácidos oleico, linolênico e rumênico dentro dos reatores.

8. CONCLUSÃO

A presente tese traçou um caminho que se alinha com as tendências pelo desenvolvimento sustentável de alimentos mais saudáveis. Conclui-se que o subproduto de caju desidratado (SC) foi um substrato funcional com capacidade de fermentação seletiva por cepa probiótica *Lacticaseibacillus paracasei* subsp. *paracasei* F-19® e starter *Streptococcus thermophilus* ST-M6®. Essas, por sua vez, apresentaram boa viabilidade em leite fermentado quando adicionado de SC ou não, porém a presença do subproduto incrementou significativamente a composição de compostos fenólicos e atividade antioxidante durante armazenamento. Com o uso das formulações com F-19® e ST-M6® no SEMH® foi observado que a presença ou não de SC interferiu positivamente na composição funcional e antioxidante da microbiota intestinal assim como na proporção de grupos microbianos específicos. Aumento de *Bifidobacterium* spp, *Lactobacillus* spp, Actinobacteria, *Lacticaseibacillus paracasei* subsp. *paracasei* F-19® e redução de *Clostridium* cluster I e γ -Proteobacteria. O leite fermentado com e sem SC representou uma alternativa de novo alimento com melhor perfil nutricional e potencialidade de ser considerado um simbiótico sinérgico (quando na presença de SC).

9. SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

Maiores estudos quanto aos metabólitos de compostos formados pela fermentação colônica das formulações de leite fermentado com e sem subproduto de caju no SEMH® são demandados. Devido à pandemia de SARS-COV2, a disponibilidade de laboratórios e equipamentos estava inviabilizada nos meses que precederam a defesa dessa tese. Porém, material amostral para avaliação do teor de amônia livre e ácidos graxos de cadeia curta existe e será encaminhado para análise o quanto antes. Outros estudos com o subproduto de caju, associado à cepa *Lacticaseibacillus paracasei* subsp *paracasei* F-19® em leite fermentado ou não devem ser os próximos passos, principalmente em modelos *in vivo* e em ensaios clínicos. Adicionalmente, uma análise sensorial com testes de aceitação subjetivos e de intenção de compra devem ser realizados com as formulações de leite fermentado durante a sua vida de prateleira.

REFERÊNCIAS

ALBUQUERQUE, M. A. C. DE et al. Tropical fruit by-products water extracts as sources of soluble fibres and phenolic compounds with potential antioxidant, anti-inflammatory, and functional properties. **Journal of Functional Foods**, v. 52, n. December 2018, p. 724–733, jan. 2019.

ALBUQUERQUE, M. A. C. et al. Influence of passion fruit by-product and fructooligosaccharides on the viability of *Streptococcus thermophilus* TH-4 and *Lactobacillus rhamnosus* LGG in folate bio-enriched fermented soy products and their effect on probiotic survival and folate bio-access. **International Journal of Food Microbiology**, v. 292, n. December 2018, p. 126–136, mar. 2019.

ALBUQUERQUE, M. A. C. et al. Passion fruit by-product and fructooligosaccharides stimulate the growth and folate production by starter and probiotic cultures in fermented soymilk. **International Journal of Food Microbiology**, v. 261, n. August, p. 35–41, nov. 2017.

ALBUQUERQUE, M. A. C. DE et al. Supplementation with fruit and okara soybean by-products and amaranth flour increases the folate production by starter and probiotic cultures. **International Journal of Food Microbiology**, v. 236, p. 26–32, nov. 2016.

ANHÊ, F. F. et al. A polyphenol-rich cranberry extract protects from diet-induced obesity, insulin resistance and intestinal inflammation in association with increased *Akkermansia* spp. population in the gut microbiota of mice. **Gut**, v. 64, n. 6, p. 872–883, 2015.

ASSOCITATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS. **Official Methods of Analysis of AOAC International**. 19th. ed. Washinton: [s.n.], 2012

ARUMUGAM, M. et al. Enterotypes of the human gut microbiome. **Nature**, v. 473, n. 7346, p. 174–180, 12 maio 2011.

BABBAR, N.; OBEROI, H. S.; SANDHU, S. K. **Therapeutic and Nutraceutical Potential of Bioactive Compounds Extracted from Fruit Residues**. v. 55, p. 319-337, 2015

BALASUNDRAM, N.; SUNDRAM, K.; SAMMAN, S. Phenolic compounds in plants and agri-industrial by-products: Antioxidant activity, occurrence, and potential uses. **Food Chemistry**, v. 99, n. 1, p. 191–203, 2006.

BANERJEE, J. et al. Bioactives from fruit processing wastes: Green approaches to valuable chemicals. **Food Chemistry**, v. 225, p. 10–22, jun. 2017.

BARBIERI, R. et al. Phytochemicals for human disease: An update on plant-derived compounds antibacterial activity. **Microbiological Research**, v. 196, p. 44–68, 2017.

BERES, C. et al. Antioxidant dietary fibre recovery from Brazilian Pinot noir grape pomace. **Food Chemistry**, v. 201, p. 145-152, 2016.

- BERES, C. et al. Towards integral utilization of grape pomace from winemaking process: A review. **Waste Management**, v. 68, p. 581–594, out. 2017.
- BERRY, A. D.; SARGENT, S. A. **Cashew apple and nut (Anacardium occidentale L.)**. [s.l.] Woodhead Publishing Limited, 2011.
- BACCHETTI DE GREGORIS, T. et al. Improvement of phylum- and class-specific primers for real-time PCR quantification of bacterial taxa. **Journal of Microbiological Methods**, v. 86, n. 3, p. 351–356, set. 2011.
- BEUKEMA, M.; FAAS, M. M.; DE VOS, P. The effects of different dietary fiber pectin structures on the gastrointestinal immune barrier: impact via gut microbiota and direct effects on immune cells. **Experimental and Molecular Medicine**, v. 52, n. 9, p. 1364–1376, 2020.
- BHANDARKAR, N. S. et al. Modulation of gut microbiota by spent coffee grounds attenuates diet-induced metabolic syndrome in rats. **FASEB Journal**, v. 34, n. 3, p. 4783–4797, 2020.
- BIANCHI, F. et al. Modulation of gut microbiota from obese individuals by in vitro fermentation of citrus pectin in combination with *Bifidobacterium longum* BB-46. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 102, n. 20, p. 8827–8840, 18 out. 2018.
- BIANCHI, F. et al. In vitro modulation of human gut microbiota composition and metabolites by *Bifidobacterium longum* BB-46 and a citric pectin. **Food Research International**, v. 120, n. September, p. 595–602, 2019.
- BIGLIARDI, B.; GALATI, F. Innovation trends in the food industry: The case of functional foods. **Trends in Food Science and Technology**, v. 31, n. 2, p. 118–129, 2013.
- BLIGH, E.G.; DYER, W.J. A rapid method of total lipid extraction and purification. **Can. J. Biochem. Physiol.**, v. 37, p. 911-917, 1959.
- BOHN, T. et al. Mind the gap-deficits in our knowledge of aspects impacting the bioavailability of phytochemicals and their metabolites-a position paper focusing on carotenoids and polyphenols. **Molecular Nutrition and Food Research**, v. 59, n. 7, p. 1307–1323, 2015.
- BRASIL. **National plan for fruticulture development, Ministry of Agriculture, Livestock and Development**. Disponível em: <https://www.gov.br/agricultura/pt-br/assuntos/noticias/mapa-lanca-plano-de-fruticultura-em-parceria-com-o-setor-privado/PlanoNacionaldeDesenvolvimentodaFruticulturaMapa.pdf/view>. Acesso em: 04 jan 2020. Brasilia, 2017.
- BROWN, R.L.; SEQUEIRA, R.P.; CLARKE, T.B. The microbiota protects against respiratory infection via GM-CSF signalling. **Nature Communications**, v. 8, p. 1512, 2017
- BUSSOLO DE SOUZA, C. et al. Degradation of fibres from fruit by-products allows selective modulation of the gut bacteria in an in vitro model of the proximal colon. **Journal of Functional Foods**, v. 57, n. April, p. 275–285, 2019.

BUTTÓ, L. F.; HALLER, D. Dysbiosis in intestinal inflammation: Cause or consequence. **International Journal of Medical Microbiology**, v. 306, n. 5, p. 302–309, 2016.

BYUN, R. et al. Quantitative analysis of diverse *Lactobacillus* species present in advanced dental caries. **Journal of Clinical Microbiology**, v.42, n.7, p.3128-3136, 2004.

CAMPANELLA, D. et al. Exploitation of grape marc as functional substrate for lactic acid bacteria and bifidobacteria growth and enhanced antioxidant activity. **Food Microbiology**, v. 65, p. 25–35, ago. 2017.

CAMPOS, D. A. et al. Impact of functional flours from pineapple by-products on human intestinal microbiota. **Journal of Functional Foods**, v. 67, n. February, p. 103830, 2020.

CARBONELL-CAPELLA, J. M. et al. Quality parameters, bioactive compounds and their correlation with antioxidant capacity of commercial fruit based baby foods. **Food Science and Technology International**, v. 20, p. 479-487, 2014

CASAROTTI, S.N. et al. Guava, orange and passion fruit by-products: characterization and its impacts on kinetics of acidification and properties of probiotic fermented products. **LWT – Food Science and Technology**, v. 98, p. 69-76, 2018

CASH, H. L. et al. Symbiotic bacteria direct expression of an intestinal bacterial Lectin. **NIH Public Access**, v. 313, n. 5790, p. 1126–1130, 2006.

CAVAGLIERI, C. R. et al. Differential effects of short-chain fatty acids on proliferation and production of pro- and anti-inflammatory cytokines by cultured lymphocytes. **Life Sciences**, v. 73, n. 13, p. 1683–1690, ago. 2003.

CHACAR, S. et al. The Impact of Long-Term Intake of Phenolic Compounds-Rich Grape Pomace on Rat Gut Microbiota. **Journal of Food Science**, v. 83, n. 1, p. 246–251, jan. 2018.

CLARK, A.; MACH, N. Exercise-induced stress behavior, gut-microbiota-brain axis and diet: A systematic review for athletes. **Journal of the International Society of Sports Nutrition**, v. 13, n. 1, p. 1–21, 2016.

COMAN, V. et al. Bioactive potential of fruit and vegetables wastes. **Advances in Food and Nutrition Research**, v. 91, p. 157-225, 2020.

CONLON, M.; BIRD, A. The Impact of Diet and Lifestyle on Gut Microbiota and Human Health. **Nutrients**, v. 7, n. 1, p. 17–44, 24 dez. 2014.

CORRÊA, R. C. G. et al. Stability and biological activity of Merlot (*Vitis vinifera*) grape pomace phytochemicals after simulated *in vitro* gastrointestinal digestion and colonic fermentation. **Journal of Functional Foods**, v. 36, p. 410–417, set. 2017.

CORY, H. et al. The role of polyphenols in human health and food systems: a mini-review. **Frontiers in Nutrition**, v.5, n.87, 2018.

COSTANTINI, L. et al. Fatty Acids and Gut Microbiota. In: **Reference Module in Food Science**. [s.l.] Elsevier, 2022. p. 1–15.

DA SILVA, J.K. et al. Antioxidant activity of aqueous extract of passion fruit (*Passiflora edulis*) leaves: in vitro and in vivo study. **Food Research International**, v. 53, n. 1, p. 882-890, 2013.

DEMIRCI, M. et al. Bacteroidetes and Firmicutes levels in gut microbiota and effects of hosts TLR2/TLR4 gene expression levels in adult type 1 diabetes patients in Istanbul, Turkey. **Journal of Diabetes and its Complications**, v. 34, n. 2, p. 2–6, 2020.

DEVKOTA, S. et al. Dietary-fat-induced taurocholic acid promotes pathobiont expansion and colitis in IL10^{-/-} mice. **Nature**, v. 487, n. 7405, p. 104–108, 2012.

DIAS, J.F. et al. Acid lactic bacteria as a bio-preservant for grape pomace beverage. **Frontiers in Sustainable Food Systems**, v.2, n. 58, 2018.

DOMÍNGUEZ DÍAZ, L.; FERNÁNDEZ-RUIZ, V.; CÁMARA, M. The frontier between nutrition and pharma: The international regulatory framework of functional foods, food supplements and nutraceuticals. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 60, n. 10, p. 1738–1746, 2020.

DOMÍNGUEZ DÍAZ, L.; FERNÁNDEZ-RUIZ, V.; CÁMARA, M. An international regulatory review of food health-related claims in functional food products labeling. **Journal of Functional Foods**, v. 68, p. 103896, 2020.

DUARTE, F. N. D. et al. Potential prebiotic properties of cashew apple (*Anacardium occidentale* L.) agro-industrial byproduct on *Lactobacillus* species. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 97, n. 11, p. 3712–3719, ago. 2017.

DUEÑAS, M. et al. A Survey of Modulation of Gut Microbiota by Dietary Polyphenols. **BioMed Research International**, v. 2015, p. 1–15, 2015.

DUQUE, A. L. R. F. et al. An exploratory study on the influence of orange juice on gut microbiota using a dynamic colonic model. **Food Research International**, v. 84, p. 160–169, jun. 2016.

ESPARZA, I. et al. Fruit and vegetable waste management: Conventional and emerging approaches. **Journal of Environmental Management**, v. 265, n. July 2019, p. 110510, jul. 2020.

ESPÍN, J. C.; GONZÁLEZ-SARRÍAS, A.; TOMÁS-BARBERÁN, F. A. The gut microbiota: A key factor in the therapeutic effects of (poly)phenols. **Biochemical Pharmacology**, v. 139, p. 82–93, 2017.

ETXEBERRIA, U. et al. Reshaping faecal gut microbiota composition by the intake of trans-resveratrol and quercetin in high-fat sucrose diet-fed rats. **Journal of Nutritional Biochemistry**, v. 26, n. 6, p. 651–660, 2015.

FAOSTAT, FAO. **Statistical database from crop production (FAOSTAT)**. Disponível em: <http://www.fao.org/faostat/en/#data/QC/>. Acesso em: 28 mai 2020.

FARAG, M. A. et al. Metabolomics reveals impact of seven functional foods on metabolic pathways in a gut microbiota model. **Journal of Advanced Research**, v. 23, p. 47–59, 2020.

FARIAS, D. DE P. et al. Prebiotics: Trends in food, health and technological applications. **Trends in Food Science and Technology**, v. 93, n. July, p. 23–35, 2019.

FILGUEIRAS, H.; MOSCA, J.; ALVES, R.; MENEZES, J. Cashew apple for fresh consumption: Research on harvest and postharvest handling technology in Brazil. **Acta Horticulturae**, v.485 n.1, 155–160, 1999.

FINUCANE, M. M. et al. A taxonomic signature of obesity in the microbiome? Getting to the guts of the matter. **PLoS One**, v. 9, n. 1, Art.No e84689, 2014

FIORDA, F. A. et al. Farinha de bagaço de mandioca: Aproveitamento de subproduto e comparação com fécula de mandioca. **Pesquisa Agropecuaria Tropical**, v. 43, n. 4, p. 408–416. 2013

FRAGA, C. G. et al. The effects of polyphenols and other bioactives on human health. **Food and Function**, v. 10, n. 2, p. 514–528, 2019.

FREIRE, F. C. et al. Impact of multi-functional fermented goat milk beverage on gut microbiota in a dynamic colon model. **Food Research International**, v. 99, n. May, p. 315–327, set. 2017.

FUKE, G.; NORNBERG, J.L. Systematic evaluation on the effectiveness of conjugated linoleic acid in human health. **Crit Rev Food Sci Nutr**, v. 57, n.1, p. 1-7, 2017

GARCÍA-VILLALBA, R. et al. Gastrointestinal simulation model TWIN-SEMH shows differences between human urolithin-metabotypes in gut microbiota composition, pomegranate polyphenol metabolism, and transport along the intestinal tract. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 65, n. 27, p. 5480–5493, 2017.

GASPEROTTI, M. et al. Fate of Microbial Metabolites of Dietary Polyphenols in Rats: Is the Brain Their Target Destination? **ACS Chemical Neuroscience**, v. 6, n. 8, p. 1341–1352, 2015.

GENSBERGER, E. T. et al. Evaluation of quantitative PCR combined with PMA treatment for molecular assessment of microbial water quality. **Water Research**, v. 67, n. 0, p. 367–376, 2014.

GHOLAMI, Z.; KHOSRAVI-DARANI, K. An Overview of Conjugated Linoleic Acid: Microbial Production and Application. **Mini-Reviews in Medicinal Chemistry**, v. 14, n. 9, p. 734–746, 2014.

GIBSON, G. R. et al. Expert consensus document: The International Scientific Association for Probiotics and Prebiotics (ISAPP) consensus statement on the definition and scope of prebiotics. **Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology**, v. 14, n. 8, p. 491–502, 14 ago. 2017.

GIL-SÁNCHEZ, I. et al. Chemical characterization and in vitro colonic fermentation of grape pomace extracts. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 97, n. 10, p. 3433–3444, ago. 2017.

GIL-SÁNCHEZ, I. et al. Dynamic gastrointestinal digestion of grape pomace extracts: Bioaccessible phenolic metabolites and impact on human gut microbiota. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 68, n. May 2017, p. 41–52, mai. 2018.

GIL-SÁNCHEZ, I. et al. Supplementation with grape pomace in healthy women: Changes in biochemical parameters, gut microbiota and related metabolic biomarkers. **Journal of Functional Foods**, v. 45, n. November 2017, p. 34–46, jun. 2018.

GOEL, A.; GUPTA, M.; AGGARWAL, R. Gut microbiota and liver disease. **Journal of Gastroenterology and Hepatology**, v. 29, n. 6, p. 1139–1148, 2014.

GÓMEZ-GARCÍA, R. et al. Valorization of melon fruit (*Cucumis melo* L.) by-products: Phytochemical and Biofunctional properties with Emphasis on Recent Trends and Advances. **Trends in Food Science and Technology**, v. 99, n. August 2019, p. 507–519, 2020.

GONZÁLEZ-AGUILAR, G. A. et al. Polyphenols associated with dietary fibers in plant foods: molecular interactions and bioaccessibility. **Current Opinion in Food Science**, v. 13, p. 84–88, 2017

GU, Y. et al. Evaluation of FAAs and FFAs in yogurts fermented with different starter cultures during storage. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 96, n. September 2020, p. 103666, 2021.

HERIGSTAD, B.; HAMILTON, M.; HEERSINK, J. How to optimize the drop plate method for enumerating bacteria. **Journal of Microbiological Methods**, v. 44, n. 2, p. 121–129, 2001.

HILL, C. et al. Expert consensus document: The international scientific association for probiotics and prebiotics consensus statement on the scope and appropriate use of the term probiotic. **Nature Reviews Gastroenterology and Hepatology**, v. 11, n. 8, p. 506–514, 2014.

HOFFMANN, C. et al. **Microbiota, probióticos e saúde.** Disponível em: <https://ilsibrasil.org/publication/microbioma-probioticos-e-saude/>. Acesso em: 05 jan 2020, v. 8 p. 60, São Paulo, 2017

HOLLISTER, E. B.; GAO, C.; VERSALOVIC, J. Compositional and functional features of the gastrointestinal microbiome and their effects on human health. **Gastroenterol**, v. 146, p. 1449–58, 2014

INDIRA, M. et al. Bioactive molecules of probiotic bacteria and their mechanism of action: a review. **3 Biotech**, v. 9, n. 8, p. 306, 24 ago. 2019.

IVERSON, S.J.; LANG, S.L.C.; COOPER, M.H. Comparison of the Bligh and Dyer and Folch methods for total lipid determination in a broad range of marine tissue. **Lipids**, v. 36, p. 1283–1287, 2001.

JAKOBEK, L.; MATIĆ, P. Non-covalent dietary fiber - Polyphenol interactions and their influence on polyphenol bioaccessibility. **Trends in Food Science & Technology**, v. 83, p. 235–247, jan. 2019.

JONES, R. M. The Use of *Lactobacillus casei* and *Lactobacillus paracasei* in Clinical Trials for the Improvement of Human Health. In: **The Microbiota in Gastrointestinal Pathophysiology: Implications for Human Health, Prebiotics, Probiotics, and Dysbiosis**. [s.l.] Elsevier Inc., p. 99–108, 2017.

KARACA, O. B. et al. Effects of Apricot Fibre on the Physicochemical Characteristics, the Sensory Properties and Bacterial Viability of Nonfat Probiotic Yoghurts. **Foods**, 8, 33; 2019.

KARADAG A, OZCELIK B AND SANER S. Review of methods to determine antioxidant capacities. **Food Analytical Methods**, v. 2, n. 1, p. 41–60, 2009.

KAPRASOB, R. et al. B vitamins and prebiotic fructooligosaccharides of cashew apple fermented with probiotic strains *Lactobacillus* spp., *Leuconostoc mesenteroides* and *Bifidobacterium longum*. **Process Biochemistry**, v. 70, n. February, p. 9–19, jul. 2018.

KEMPERMAN, R. A. et al. Impact of polyphenols from black tea and red wine/grape juice on a gut model microbiome. **Food Research International**, v. 53, n. 2, p. 659–669, 2013

KOUTSOS, A. et al. Effects of commercial apple varieties on human gut microbiota composition and metabolic output using an in vitro colonic model. **Nutrients**, v. 9, n. 6, p. 1–23, 2017.

KOWALSKA, H. et al. What's new in biopotential of fruit and vegetable by-products applied in the food processing industry. **Trends in Food Science and Technology**, v. 67, p. 150–159, 2017.

KUMAR, K. et al. Food waste: a potential bioresource for extraction of nutraceuticals and bioactive compounds. **Bioresources and Bioprocessing**, v. 4, p. 4-18, 2018.

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

LEE, S.I.; KANG, K.S. Function of capric acid in cyclophosphamide-induced intestinal inflammation, oxidative stress, and barrier function in pigs. **Sci Rep**, v. 7, n. 16530, 2017

LEY, R. E. Obesity and the human microbiome. **Curr Opin Gastroenterol**, v. 26, n. 1, p. 5–11, 2010.

LI, D. et al. The gut microbiota: A treasure for human health. **Biotechnology Advances**, v. 34, n. 7, p. 1210–1224, nov. 2016.

LI, L. et al. The adhesion of the gut microbiota to insoluble dietary fiber from soy hulls promoted the proliferation of probiotics in vitro. **Lwt**, v. 153, n. September 2021, p. 112560, 2021.

LIMA, J. R. et al. Desidratação da fibra do caju para utilização em produtos alimentícios. **Boletim de Pesquisa Número 91 - Embrapa** Fortaleza, Brasil, 2014.

LUCA, S. V. et al. Bioactivity of dietary polyphenols: The role of metabolites. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 60, n. 4, p. 626–659, 21 fev. 2020.

MACPHERSON, A. J.; HARRIS, N. L. Opinion: Interactions between commensal intestinal bacteria and the immune system. **Nature Reviews Immunology**, v. 4, n. 6, p. 478–485, jun. 2004.

MAGALHÃES, L. M. et al. Rapid microplate high-throughput methodology for assessment of Folin-Ciocalteu reducing capacity. **Talanta**, v. 83, p. 441-447, 2010.

MARAND, M. A. et al. Fortification of yogurt with flaxseed powder and evaluation of its fatty acid profile, physicochemical, antioxidant, and sensory properties. **Powder Technology**, v. 359, p.76–84, 2020.

MARCO, M. L. et al. The International Scientific Association for Probiotics and Prebiotics (ISAPP) consensus statement on fermented foods. **Nature Reviews Gastroenterology and Hepatology**, 2021.

MATEOS-APARICIO, I. et al. Apple by-product dietary fibre exhibits potential prebiotic and hypolipidemic effectsin high-fat fed Wistar rats. **Bioactive Carbohydrates and Dietary Fibre**, v. 23, p. 100219, 2020.

MEDEIROS, I. U. D. DE et al. Characterization and functionality of fibre-rich pomaces from the tropical fruit pulp industry. **British Food Journal**, v. 122, n. 3, p. 813–826, 20 dez. 2019.

MELLO, C. S. et al. Fecal microbiota analysis of children with small intestinal bacterial overgrowth among residents of an urban slum in Brazil. **Jornal de Pediatria (Versão em Português)**, v. 94, n. 5, p. 483–490, 2018.

MENEZES, F. N. D. D. et al. Impact of Cashew (*Anacardium occidentale* L.) by-Product on Composition and Metabolic Activity of Human Colonic Microbiota In Vitro Indicates Prebiotic Properties. **Current Microbiology**, v. 78, n. 6, p. 2264–2274, 2021.

MOLDOVAN, B. et al. Antioxidant activity of Cornelian cherry (*Cornus mas* L.) fruits extract and the in vivo evaluation of its anti-inflammatory effects. **Journal of Functional Foods**, v. 26, p. 77-87, 2016.

MONAGAS, M. et al. Insights into the metabolism and microbial biotransformation of dietary flavan-3-ols and the bioactivity of their metabolites. **Food & Function**, v. 1, n. 3, p. 233, 2010.

MORAIS, C. A. et al. Anthocyanins as inflammatory modulators and the role of the gut microbiota. **The Journal of Nutritional Biochemistry**, v. 33, p. 1–7, jul. 2016.

MORRISON, D. J.; PRESTON, T. Formation of short chain fatty acids by the gut microbiota and their impact on human metabolism. **Gut Microbes**, v. 7, n. 3, p. 189–200, 2016

MUÑOZ-GONZÁLEZ, I. et al. Profiling of microbial-derived phenolic metabolites in human feces after moderate red wine intake. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 61, n. 39, p. 9470–9479, 2013.

MULTARI, S. et al. Changes in the volatile profile, fatty acid composition and other markers of lipid oxidation of six different vegetable oils during short-term deep-frying. **Food Research International**. v.122, 318-329, 2019

NEVES CASAROTTI, S. et al. Probiotic low-fat fermented goat milk with passion fruit by-product: In vitro effect on obese individuals' microbiota and on metabolites production. **Food Research International**, v. 136, n. September 2019, p. 109453, 2020.

NOCKER, A. et al. Selective detection of live bacteria combining propidium monoazide sample treatment with microarray technology. **Journal of Microbiological Methods**, v. 76, n. 3, p. 253–261, 2009.

OZDAL, T. et al. The Reciprocal Interactions between Polyphenols and Gut Microbiota and Effects on Bioaccessibility. **Nutrients**, v. 8, n. 2, p. 1–36, 6 fev. 2016.

PADILHA, M. et al. A prebiotic mixture improved Lactobacillus acidophilus and Bifidobacterium animalis gastrointestinal in vitro resistance in petit-suisse. **Food Funct.**, v. 7, n. 5, p. 2312–2319, 2016.

PARKER, E. A. et al. Probiotics and gastrointestinal conditions: An overview of evidence from the Cochrane Collaboration. **Nutrition**, v. 45, n. 6, p. 125–134, jan. 2018.

PEREIRA, A. L. F.; MACIEL, T. C.; RODRIGUES, S. Probiotic beverage from cashew apple juice fermented with Lactobacillus casei. **Food Research International**, v. 44, n. 5, p. 1276–1283, jun. 2011.

PÉREZ-BURILLO, S. et al. Potential probiotic salami with dietary fiber modulates antioxidant capacity, short chain fatty acid production and gut microbiota community structure. **LWT**, v. 105, n. January, p. 355–362, maio 2019.

PERRY, R. J. et al. Acetate mediates a microbiome-brain-β-cell axis to promote metabolic syndrome. **Nature**, v. 534, n. 7606, p. 213–217, 2016.

POZUELO, M. J. et al. Grape Antioxidant Dietary Fiber Stimulates Lactobacillus Growth in Rat Cecum. **Journal of Food Science**, v. 77, n. 2, p. H59–H62, fev. 2012.

QUIRÓS-SAUCEDA, A. E. et al. Dietary fiber and phenolic compounds as functional ingredients: interaction and possible effect after ingestion. **Food Funct.**, v. 5, n. 6, p. 1063–1072, 2014.

QUIRÓS-SAUCEDA, A.E., Impact of fruit dietary fibres and polyphenols on modulation of the human gut microbiota. In: **Fruit and Vegetables Phytochemicals: Chemistry and Human Health**, Volume I, 2º Edition. Editor: Elhadi M. Yahia. John Wiley & Sons Ltd, 2018.

- RICO, X. et al. Recovery of high value-added compounds from pineapple, melon, watermelon and pumpkin processing by-products: An overview. **Food Research International**, v. 132, p. 109086, 2020.
- RINNINELLA, E. et al. What is the Healthy Gut Microbiota Composition? A Changing Ecosystem across Age, Environment, Diet, and Diseases. **Microorganisms**, v. 7, n. 1, p. 14, 10 jan. 2019.
- RIZZATTI, G. et al. Proteobacteria: A Common Factor in Human Diseases. **BioMed Research International**, v. 2017, p. 1–7, 2017.
- ROBBINS, R. J. Phenolic acids in foods: An overview of analytical methodology. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 51, p. 2866–2887, 2003.
- ROBERT, C.; BERNALIER-DONADILLE, A. The cellulolytic microflora of the human colon: Evidence of microcrystalline cellulose-degrading bacteria in methane-excreting subjects. **FEMS Microbiology Ecology**, v. 46, n. 1, p. 81–89, 2003.
- ROMERO-LOPEZ, M. R. et al. Fiber Concentrate from Orange (*Citrus sinensis* L.) Bagasse: Characterization and Application as Bakery Product Ingredient. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 12, n. 4, p. 2174–2186, 2011.
- RUBERT, J. et al. Intestinal Organoids: A Tool for Modelling Diet–Microbiome–Host Interactions. **Trends in Endocrinology & Metabolism**, v. xx, n. xx, p. 1–11, mar. 2020.
- RUSSELL, D. A. et al. Metabolic activities and probiotic potential of bifidobacteria. **International Journal of Food Microbiology**, v. 149, n. 1, p. 88–105, set. 2011.
- SABINO BATISTA, K. et al. Beneficial effects of consumption of acerola, cashew or guava processing by-products on intestinal health and lipid metabolism in dyslipidaemic female Wistar rats. **British Journal of Nutrition**, v. 119, p. 30–41, 2018.
- SABINO, L. B. DE S. et al. Polysaccharides from acerola, cashew apple, pineapple, mango and passion fruit co-products: Structure, cytotoxicity and gastroprotective effects. **Bioactive Carbohydrates and Dietary Fibre**, v. 24, n. June, p. 100228, out. 2020.
- SAH, B. N. P. et al. Effect of pineapple waste powder on probiotic growth, antioxidant and antimutagenic activities of yogurt. **Journal of Food Science and Technology**, v. 53, n. 3, p. 1698–1708, 2016.
- SÁNCHEZ-PATÁN, F. et al. Comparative in vitro fermentations of cranberry and grape seed polyphenols with colonic microbiota. **Food Chemistry**, v. 183, p. 273–282, set. 2015.
- SASOT, G. et al. Identification of phenolic metabolites in human urine after the intake of a functional food made from grape extract by a high resolution LTQ-Orbitrap-MS approach. **Food Research International**, v. 100, p. 435–444, out. 2017.
- SAURA-CALIXTO, F. et al. Proanthocyanidin metabolites associated with dietary fibre from in vitro colonic fermentation and proanthocyanidin metabolites in human plasma. **Molecular Nutrition and Food Research**, v. 54, p. 939–946, 2010.

SÁYAGO-AYERDI, S. G.; ZAMORA-GASGA, V. M.; VENEMA, K. Prebiotic effect of predigested mango peel on gut microbiota assessed in a dynamic in vitro model of the human colon (TIM-2). **Food Research International**, v. 118, n. October 2017, p. 89–95, abr. 2019.

SCALBERT, A. et al. Dietary Polyphenols and the Prevention of Diseases. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 45, n. 4, p. 287–306, jun. 2005.

SCHNORR, S. L. et al. Insights into human evolution from ancient and contemporary microbiome studies. **Current Opinion in Genetics & Development**, v. 41, n. JUL, p. 14–26, dez. 2016.

SERAFEIMIDOU, A. et al. Chemical characteristics, fatty acid composition and conjugated linoleic acid (CLA) content of traditional Greek yogurts. **Food Chemistry**, v. 134, n. 4, p. 1839–1846, 2012.

SHEN, J.; OBIN, M. S.; ZHAO, L. The gut microbiota, obesity and insulin resistance. **Mol Aspects Med**, v. 34, n. 1, p. 39-58, 2013

SHIN, N. R.; WHON, T. W.; BAE, J. W. Proteobacteria: Microbial signature of dysbiosis in gut microbiota. **Trends in Biotechnology**, v. 33, n. 9, p. 496–503, 2015.

SIES, H.; STAHL, W.; SEVANIAN, A. Nutritional, Dietary and Postprandial Oxidative Stress. **The Journal of Nutrition**, v. 135, n. 5, p. 969–972, 1 maio 2005.

SIEUWERTS, S.; HÅKANSSON, J. Development of a Standardized Method For The Quantification of Lactobacillus Paracasei F19 In Stool Samples Of Various Ages. **E C Nutrition**, v. 03, n. 03, p. 1–16, 2016.

SINGH, N. et al. Activation of Gpr109a, receptor for niacin and the commensal metabolite butyrate, suppresses colonic inflammation and carcinogenesis. **Immunity**, v. 40, n. 1, p. 128–139, 2014.

SIQUEIRA, A. M. DE A.; BRITO, E. S. DE. Aproveitamento do bagaço do caju para alimentação humana e utilização em outras indústrias de alimentos. In: ARAÚJO, J. P. P. DE (Ed.). **Agronegócio caju: práticas e inovações**. [s.l.] Embrapa, 2003. p. 351–376

SIRÓ, I. et al. Functional food. Product development, marketing and consumer acceptance—A review. **Appetite**, v. 51, n. 3, p. 456–467, nov. 2008.

SIVIERI, K. et al. Prebiotic Effect of Fructooligosaccharide in the Simulator of the Human Intestinal Microbial Ecosystem (SEMH ® Model). **Journal of Medicinal Food**, v. 17, n. 8, p. 894–901, ago. 2014.

SHAHIDI, F.; AMBIGAIPALAN, P. Phenolics and polyphenolics in foods, beverages and spices: Antioxidant activity and health effects – A review. **Journal of Functional Foods**, v. 18, p. 820–897, out. 2015.

SHAHIDI, F.; NACZK, M. Phenolics in food and nutraceuticals. Boca Raton, FL: CRC Press. 2004 pp. 558

SHIRAI, N.; SUZUKI, H.; WADA, S. Direct methylation from mouse plasma and from liver and brain homogenates. **Analytical biochemistry**, v. 343, n. 1, p. 48-53, 2005

SONG, Y.; LIU, C.; FINEGOLD, S. M. Real-time PCR quantitation of clostridia in feces of autistic children. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 70, n. 11, p. 6459–6465, 2004.

STRUCK, S. et al. Berry pomace - a review of processing and chemical analysis of its polyphenols. **International Journal of Food Science & Technology**, v. 51, n. 6, p. 1305–1318, jun. 2016.

TERRA, X. et al. Flavonoids as Protective Agents Against Diet-Induced Oxidative Damage at Gastrointestinal Tract. In: GRACIA-SANCHO, J.; SALVADÓ, J. (Eds.). **Gastrointestinal Tissue**. Spain: Academic Press, 2017. p. 327–338.

TOMÁS-BARBERÁN, F. A.; SELMA, M. V.; ESPÍN, J. C. Interactions of gut microbiota with dietary polyphenols and consequences to human health. **Current Opinion in Clinical Nutrition and Metabolic Care**, v. 19, n. 6, p. 471–476, nov. 2016.

TOURIÑO, S. et al. Metabolites in contact with the rat digestive tract after ingestion of a phenolic-rich dietary fiber matrix. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 59, n. 11, p. 5955–5963, 2011.

TURNBAUGH, P. J. et al. An obesity-associated gut microbiome with increased capacity for energy harvest. **Nature**, v. 444, n. 7122, p. 1027–1031, 2006.

VELDERRAIN-RODRÍGUEZ, G. et al. Effect of dietary fibre on the bioaccessibility of phenolic compounds of mango, papaya and pineapple fruits by an *in vitro* digestion model. **Food Science and Technology**, v. 36, p. 188-194, 2016

VIEIRA, A. D. S. et al. The impact of fruit and soybean by-products and amaranth on the growth of probiotic and starter microorganisms. **Food Research International**, v. 97, p. 356–363, jul. 2017.

VIEIRA, A.D.S. et al. Impact of acerola (*Malpighia emarginata* DC) by-product and probiotic strains on technological and sensory features of fermented soy beverages. **Journal of Food Science**, v. 84, p. 3726-3734, 2019.

VIEIRA, A. D. S. et al. Impact of a fermented soy beverage supplemented with acerola by-product on the gut microbiota from lean and obese subjects using an *in vitro* model of the human colon. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 105, n. 9, p. 3771–3785, 2021.

VILLARREAL, M. L. M. et al. Advantageous direct quantification of viable closely related probiotics in petit-suisse cheeses under *in vitro* gastrointestinal conditions by propidium monoazide - qPCR. **PLoS ONE**, v. 8, n. 12, p. 1–11, 2013.

WANG, B. et al. The Human Microbiota in Health and Disease. **Engineering**, v. 3, n. 1, p. 71–82, 2017.

WANG, D. et al. Role of intestinal microbiota in the generation of polyphenol-derived phenolic acid mediated attenuation of Alzheimer's disease β -amyloid oligomerization. **Molecular Nutrition & Food Research**, v. 59, n. 6, p. 1025–1040, jun. 2015.

WILLIAMSON, G.; KAY, C. D.; CROZIER, A. The Bioavailability, Transport, and Bioactivity of Dietary Flavonoids: A Review from a Historical Perspective. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, v. 17, n. 5, p. 1054–1112, 2018.

WU, G. D. et al. Linking Long-Term Dietary Patterns with Gut Microbial Enterotypes. **Science**, v. 334, n. 6052, p. 105–108, 7 out. 2011.

XAVIER DOS SANTOS, D. et al. Improved probiotic survival to in vitro gastrointestinal stress in a mousse containing Lactobacillus acidophilus La-5 microencapsulated with inulin by spray drying. **Lwt**, v. 99, n. August 2018, p. 404–410, 2019.

YAO, L. H. et al. Flavonoids in food and their health benefits. **Plant Foods for Human Nutrition**, 59, 113–122, 2004.

ZHANG, L. et al. Grape proanthocyanidin-induced intestinal bloom of Akkermansia muciniphila is dependent on its baseline abundance and precedes activation of host genes related to metabolic health. **The Journal of Nutritional Biochemistry**, v. 56, p. 142–151, jun. 2018.

ZENDEBOODI, F. et al. Probiotic: conceptualization from a new approach. **Current Opinion in Food Science**, v. 32, p. 103–123, 1 abr. 2020.

ZHAO, Z.; CORREDIG, M. Effects of pH-modification on the rennet coagulation of concentrated casein micelles suspensions. **Food Chemistry**, v. 316, n. January, 2020.

ZHENG, J. et al. A taxonomic note on the genus Lactobacillus: Description of 23 novel genera, emended description of the genus Lactobacillus Beijerinck 1901, and union of Lactobacillaceae and Leuconostocaceae. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 70, n. 4, p. 2782–2858, 1 abr. 2020.

ZHU, F. et al. Advance on the bioactivity and potential applications of dietary fibre from grape pomace. **Food Chemistry**, v. 186, p. 207–212, 2015.

ANEXO A. Sequência genômica de espécies bacterianas usadas para modelagem de primers do filo Bacteroidetes estudado em SEMH®

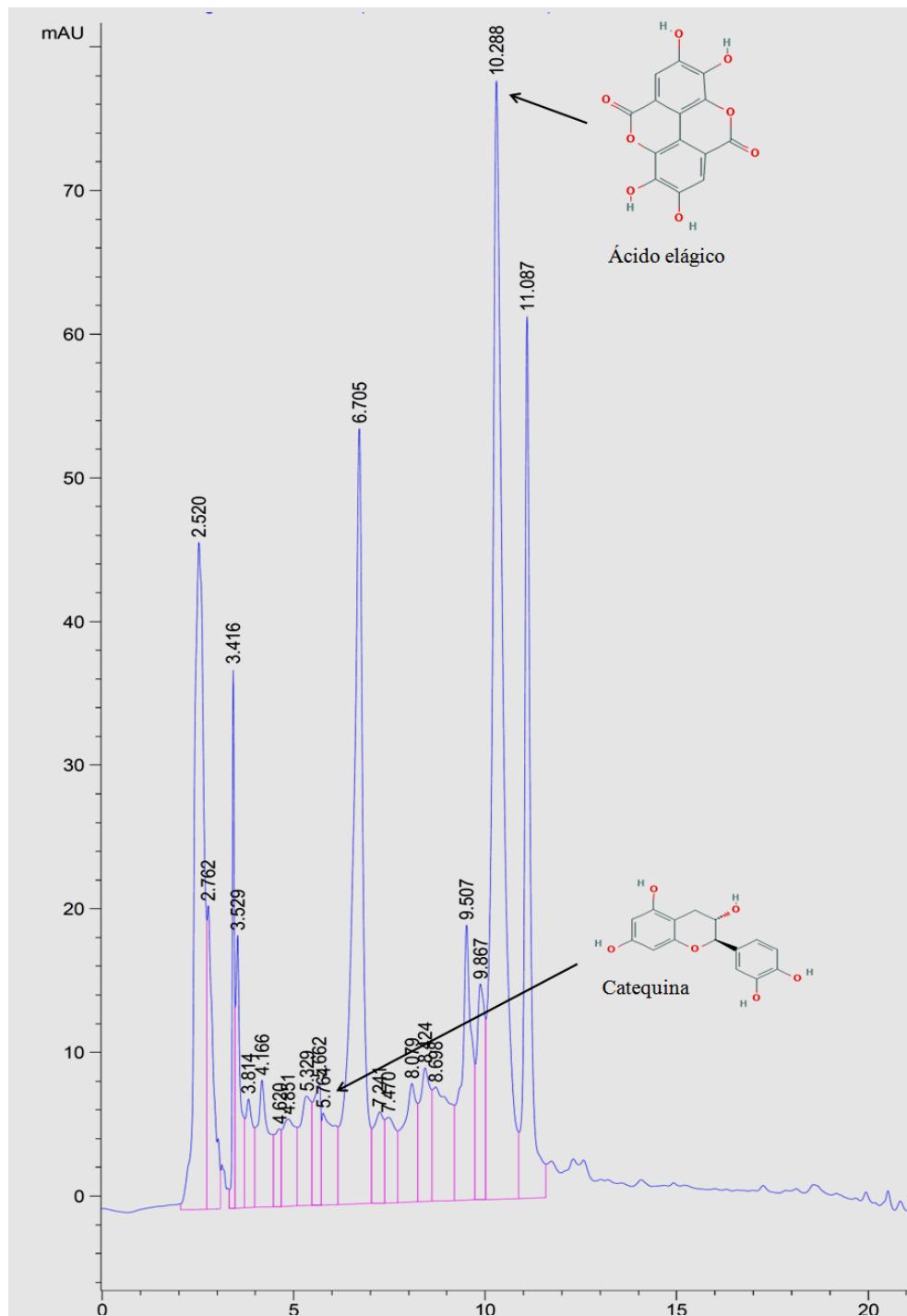
Espécie bacteriana (16SrRNA)

- Bacteroides thetaiotomicron* (Gene bank: AB050109.1)
Bacteroides vulgatus (Gene bank: AJ867050.1)
Bacteroides dorei ES-08 (Gene bank: AB714363.1)
Bacteroides dorei ES-33 (Gene bank: AB714362.1)
Bacteroides dorei ES-06 (Gene bank: AB714358.1)
Bacteroides dorei ES-14 (Gene bank: AB714352.1)
Bacteroides dorei baku-28 (Gene bank: AB714305.1)
Bacteroides dorei baku-15 (Gene bank: AB714302.1)
Bacteroides dorei baku-30 (Gene bank: AB714299.1)
Bacteroides dorei baku-29 (Gene bank: AB714298.1)
Bacteroides caccae isolate 79N_20468 (Gene bank: LT695050.1)
Bacteroides caccae isolate 84T_14063 (Gene bank: LT688648.1)
Bacteroides caccae isolate 94N_4909 (Gene bank: LT679495.1)
Bacteroides caccae isolate 94N_4881 (Gene bank: LT679467.1)
Bacteroides caccae baku-34 (Gene bank: AB714287.1)
Bacteroides caccae baku-25 (Gene bank: AB714283.1)
Bacteroides caccae baku-31 (Gene bank: AB714281.1)
Bacteroides coprocola strain M16 (Gene bank: AB200224.1)
Bacteroides coprocola strain M158 (Gene bank: AB200225.1)
Bacteroides coprosuis strain JCM 13475 (AB510699.1)
Bacteroides eggerthii strain JCM 12986 (Gene bank: NR_112935.1)
Bacteroides eggerthii isolate 206T_3875 (Gene bank: LT678461.1)
Bacteroides sp. ANH 2438 (Gene bank: AJ518875.1)
Bacteroides fragilis (Gene bank: AB050106.1)
Bacteroides intestinalis strain JCM 13266 (Gene bank: AB214329.1)
Bacteroides massiliensis strain EG4-8-2 (Gene bank: AB200226.1)
Bacteroides nordii (Gene bank: KF999872.1)
Bacteroides ovatus (Gene bank: AB050108.1)
Bacteroides plebeius strain M12 (Gene bank: AB200217.1), *Bacteroides uniformis* (Gene bank: AB050110.1)
Bacteroides pyogenes strain B38024 (Gene bank: HF558365.1)
Parabacteroides goldsteinii strain MGM002 (Gene bank: MT764994.1)
Parabacteroides distasonis strain JCM 13404 (Gene bank: AB238927.1)
Parabacteroides merdae strain JCM 9497 (Gene bank: NR_041343.1).
-

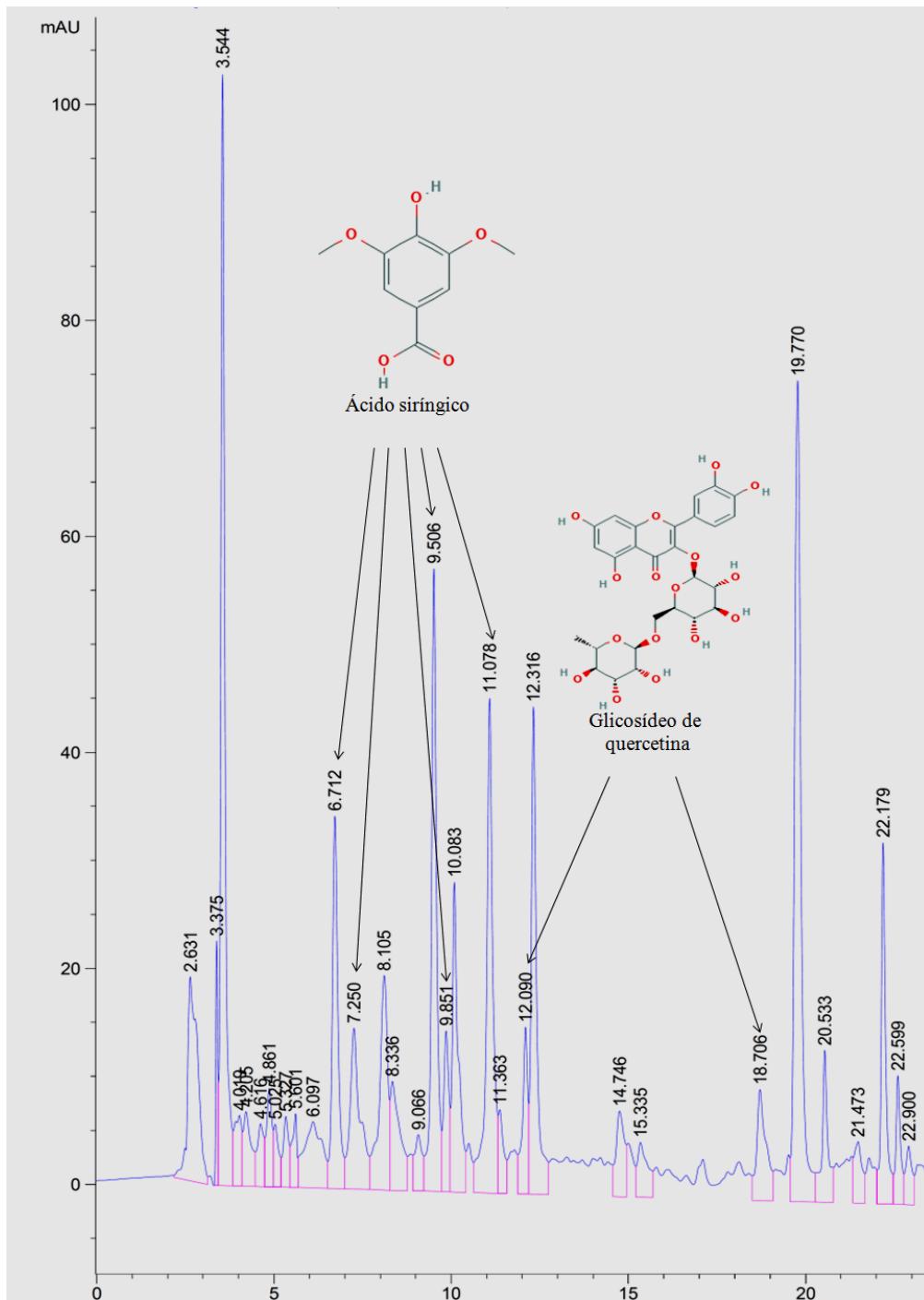
ANEXO B. Sequência genômica de espécies bacterianas usadas para modelagem de primers do gênero *Streptococcus* spp estudado em SEMH®

Espécie bacteriana (16SrRNA)
Streptococcus pyogenes strain I-273 (Gene bank: NR_028598.1)
Streptococcus mutans strain ATCC 25175 (Gene bank: NR_042772.1)
Streptococcus thermophilus strain ATCC 19258 (Gene bank: NR_042778.1)
Streptococcus dysgalactiae strain ATCC 43078 (Gene bank: NR_027517.1)
Streptococcus salivarius strain ATCC 7073 (Gene bank: NR_042776.1)
Streptococcus mitis strain NS51 (Gene bank: NR_028664.1)
Streptococcus sanguinis SK1 NCTC 7863 (Gene bank: NR_024841.1)
Streptococcus equinus ATCC 9812 (Gene bank: NR_042052.1)
Streptococcus pneumoniae strain ATCC 33400 (Gene bank: NR_028665.1).

APÊNDICE A - Cromatograma representativo e compostos fenólicos identificados por cromatografia líquida de alta eficiência dos extratos metanol / amônia - picos de retenção para respectivos tempos de retenção



APÊNDICE B - Cromatograma representativo e compostos fenólicos identificados por cromatografia líquida de alta eficiência dos extratos metanol / água - picos de retenção para respectivos tempos de retenção



APÊNDICE C – Etapas do experimento no Simulador do Ecossistema Microbiano Humano SEMH®.

FASE 1 - PADRONIZAÇÃO DA MICROBIOTA FECAL NOS REATORES R3						
Adição diária	D1 200mL feed	D2 200mL feed	D3 200mL feed	D4 200mL feed	D5 200mL feed	D6 200mL feed
FASE 2 - PADRONIZAÇÃO DA MICROBIOTA FECAL NOS REATORES R3						
Adição diária	D8 200mL feed	D9 200mL feed	D10 200mL feed	D11 200mL feed	D12 200mL feed	D13 200mL feed
FASE 3 - FASE CONTROLE						
Adição diária	D15 200mL <i>feed</i> 60mL S. Pancreático	D16 200mL <i>feed</i> 60mL S. Pancreático	D17 200mL <i>feed</i> 60mL S. Pancreático	D18 200mL <i>feed</i> 60mL S. Pancreático	D19 200mL <i>feed</i> 60mL S. Pancreático	Amostra de 20 mL R3A R3B R3C
FASE 4 - FASE EXPERIMENTAL 1						
Adição diária	D20 300 mL <i>feed</i> 240mL S. Pancreático 600 mL FC	D21 300 mL feed with Pancreatic Juice 600 mL FC	D22 300 mL feed with Pancreatic Juice 600 mL FC	D23 300 mL feed with Pancreatic Juice 600 mL FC	D24 300 mL feed with Pancreatic Juice 600 mL FC	Amostra de 20 mL R3A R3B R3C
FASE 5 - FASE DE WAHSOUT 1						
Adição diária	D25 900mL <i>feed</i> 240mL S. Pancreático	D26 900mL <i>feed</i> 240mL S. Pancreático	D27 900mL <i>feed</i> 240mL S. Pancreático	D28 900mL <i>feed</i> 240mL S. Pancreático	D29 900mL <i>feed</i> 240mL S. Pancreático	Amostra de 20 mL R3A R3B R3C
FASE 6 - FASE EXPERIMENTAL 2						
Adição diária	D30 300 mL <i>feed</i> 240mL S. Pancreático 600 mL FT	D31 300 mL <i>feed</i> 240mL S. Pancreático 600 mL FT	D32 300 mL <i>feed</i> 240mL S. Pancreático 600 mL FT	D33 300 mL <i>feed</i> 240mL S. Pancreático 600 mL FT	D34 300 mL <i>feed</i> 240mL S. Pancreático 600 mL FT	Amostra de 20 mL R3A R3B R3C
FASE 7 - FASE DE WAHSOUT 2						
Adição diária	D35 900mL <i>feed</i> 240mL S. Pancreático	D36 900mL <i>feed</i> 240mL S. Pancreático	D37 900mL <i>feed</i> 240mL S. Pancreático	D38 900mL <i>feed</i> 240mL S. Pancreático	D39 900mL <i>feed</i> 240mL S. Pancreático	Amostra de 20 mL R3A R3B R3C

Fonte: próprio autor