

UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
FACULDADE DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
DEPARTAMENTO DE NUTRIÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM NUTRIÇÃO HUMANA

CARLA VIEIRA FERREIRA CELINO

Lactobacillus plantarum SBR64.7 UnB em formulações liofilizadas a base de leite e polpa de araticum: um estudo da sobrevivência durante o armazenamento e exposição gastrointestinal *in vitro*.

BRASÍLIA

2023

CARLA VIEIRA FERREIRA CELINO

Lactobacillus plantarum SBR64.7 UnB em formulações liofilizadas a base de leite e polpa de araticum: um estudo da sobrevivência durante o armazenamento e exposição gastrointestinal *in vitro*.

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Nutrição Humana da Faculdade de Ciências da Saúde, Universidade de Brasília, como requisito para obtenção do título de Mestre em Nutrição Humana.

Orientadora: Profa. Dra. Eliana dos Santos Leandro

Coorientadora: Profa. Dra. Sandra Fernandes Arruda

BRASÍLIA

2023

CARLA VIEIRA FERREIRA CELINO

Lactobacillus plantarum SBR64.7 UnB em formulações liofilizadas a base de leite e polpa de araticum: um estudo da sobrevivência durante o armazenamento e exposição gastrointestinal *in vitro*.

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Nutrição Humana da Faculdade de Ciências da Saúde, Universidade de Brasília, como requisito para obtenção do título de Mestre em Nutrição Humana.

Aprovada em:

MEMBROS DA BANCA

Profa. Profa. Dra. Eliana dos Santos Leandro
(Presidente da Banca – Universidade de Brasília)

Profa. Dra. Raquel Braz Assunção Botelho
(Membro Interno – Universidade de Brasília)

Profa. Dra. Sascha Habu
(Membro Externo – Universidade Tecnológica Federal do Paraná)

Prof. Dra. Wilma Maria Coelho Araújo
(Suplente – Universidade de Brasília)

BRASÍLIA

2023

Carla Vieira Ferreira Celino

Lactobacillus plantarum SBR64.7 UnB em formulações liofilizadas a base de leite e polpa de araticum: um estudo da sobrevivência durante o armazenamento e exposição gastrointestinal *in vitro*/ Carla Vieira Ferreira Celino.

Dissertação de mestrado / Faculdade de Ciências da Saúde, Universidade de Brasília. Brasília, 2023.

Área de Concentração: Nutrição Humana

Orientadora: Dra. Eliana dos Santos Leandro

Coorientadora: Dra. Sandra Fernandes Arruda

1. BACTÉRIAS LÁCTICAS 2. SOBREVIVÊNCIA 3. LIOFILIZAÇÃO
4. POTENCIAL PROBIÓTICO 5. ARATICUM

AGRADECIMENTOS

Obrigada Deus Pai, Filho e Espírito Santo por mover em mim à tua vontade. E a ti mãezinha poderosa, obrigada por realizar em mim, o sonho de tornar-me mestre. Aos meus pais, meus primeiros grandes mestres, muito obrigada!!! Ao meu pai (*in memoriam*), obrigada por inspirar-me que por meio da educação, podemos transformar o mundo. À minha mãe, exemplo de coragem, força e superação, obrigada por abandonar sempre os teus sonhos em prol dos nossos. Ao meu amado esposo Vicente, a quem devo todo o meu caminhar, obrigada por ter sido minha coluna de sustentação, em todos os momentos!! Sem o teu amor, apoio e provimento, nada seria possível!! Ao meu amado filho Douglas, que com sua pureza de coração e simplicidade de criança, me impulsionou a todo momento, que seria possível e eu conseguiria. À minha amada filha Catarina, que desde o meu ventre, é exemplo de força e sustentação!! Aos meus irmãos Igor e Aline, obrigada pelas palavras de incentivo e por vibrar comigo rumo a cada conquista!! À minha orientadora, professora Eliana, pela maestria em conduzir-me pelos rumos da ciência com amor e paciência. Tua marca de delicadeza e firmeza, simplicidade e robustez pelo conhecimento ficarão para sempre marcada em meu coração. Obrigada, por tamanha confiança!! À professora Sandra, minha coorientadora, obrigada por ceder gentilmente seu conhecimento e por permitir que em seu laboratório todo o nosso experimento ganhasse vida de verdade!! À Maria Carolina, a quem com total entrega abandonou, por muitas vezes, suas necessidades, em prol das nossas!! Obrigada, Carolzinha por guiar nossas mãos tão trêmulas e desequilibradas e fazer-nos acreditar que logo elas estariam destras e confiantes!! Você foi essencial para que esse sonho se tornasse realidade!! Deus te abençoe infinitamente, minha amiga!! Às minhas companheiras de laboratório Clarissa e Luiza, obrigada por possibilitar um caminhar mais leve e entusiasta em nossas andanças pela UnB!! A todos os meus mestres, durante o período de formação, obrigada por todo conhecimento desprendido com tanta qualidade e dedicação. Obrigada ao professor Márcio Mendonça, tua alegria e motivação contagiavam todos ao seu redor!! A todos os técnicos: Pedro, Alícia, Thaís, Mário, Luís, Desterro, meu muito obrigada por ser as nossas mãos e mente, quando nada podíamos!! Sem vocês, seria impossível!!

Obrigada à CAPES por possibilitar meu crescimento pessoal e profissional!! À UnB, minha eterna Universidade!! Jamais esquecerei a mensagem ao entrar na FS, pela primeira vez!! Independentemente, de onde venhas, com certeza chegarás mais longe!!

Meu muito obrigada!!

*“Quando vistes na areia, só um par de pegadas, eram as minhas.
Foi exatamente aí que eu te carreguei em meus braços.”*

José Spera

RESUMO

Introdução: Alimentos desidratados têm sido uma alternativa para incorporação de micro-organismos probióticos. A liofilização é considerada um método eficaz para garantir a estabilidade de micro-organismos probióticos durante o armazenamento. O leite desnatado pode ser utilizado como matriz de proteção para células microbianas, mas não proporciona estabilidade durante o armazenamento. Para alcançar a estabilidade durante o armazenamento, algumas condições devem ser observadas, dentre elas: temperatura de armazenamento, umidade relativa do ambiente e presença de oxigênio. A presença do oxigênio é um dos fatores que contribui com a redução da viabilidade, levando ao estresse oxidativo. A adição de frutas nas formulações a base de leite poderá contribuir com o aumento da atividade antioxidante e, conseqüentemente, reduzir o estresse oxidativo e aumentar a viabilidade do micro-organismo. Entretanto, sabe-se que alguns compostos que apresentam atividade antioxidante podem apresentar também atividade antimicrobiana, e com isso reduzir a viabilidade do micro-organismo. **Objetivo:** O objetivo principal deste estudo foi avaliar o efeito da adição de polpa de araticum na viabilidade de *L. plantarum* SBR64.7 em formulações a base de leite após a liofilização e durante o armazenamento. **Metodologia:** Para elaboração das formulações foi utilizado leite desnatado reconstituído (LDR) a 10% e polpa de araticum. As seguintes formulações foram obtidas: (i) 100% de LDR 10% (Controle) (C); (ii) 95% LDR 10% + 5% de polpa de araticum (F1); (iii) 90% LDR 10% + 10% de polpa de araticum (F2); (iv) 85% de LDR 10% + 15% de polpa de araticum (F3). **Resultados e discussão:** A adição de polpa de araticum nas formulações não afetou significativamente ($p > 0,05$) a viabilidade de *L. plantarum* após a liofilização. Com 120 dias de armazenamento a 25°C ocorreu uma redução significativa ($p < 0,05$) da viabilidade de *L. plantarum* (3 unidades logarítmicas) nas formulações adicionadas de polpa de araticum. Já na formulação elaborada apenas com LDR 10% a redução da viabilidade foi apenas de 1 unidade logarítmica. A adição de polpa de araticum aumentou significativamente ($p < 0,05$) o teor de carboidratos das formulações. Não houve diferença significativa ($p > 0,05$) entre as formulações quanto atividade antimicrobiana contra patógenos *E. coli* ATCC 25922, *Salmonella* ATCC 700623 e *S. aureus* ATCC 27726. A tolerância de *L. plantarum* foi significativamente ($p < 0,05$) maior no tratamento com suco gástrico, seguido do suco intestinal e sucessivo. A atividade antioxidante das formulações aumentou significativamente ($p < 0,05$) durante o armazenamento. **Conclusão:** A adição de polpa de araticum não conferiu efeito protetor a viabilidade de *L. plantarum* após a liofilização, mas também não ocasionou perda de viabilidade. No entanto, com 120 dias de armazenamento observou-se que a adição de polpa de araticum afetou negativamente a viabilidade de *L. plantarum*. Mais estudos são necessários para avaliar o efeito da adição da polpa de araticum na viabilidade de *L. plantarum*.

Palavras-chave: Bactérias lácticas; sobrevivência; liofilização; potencial probiótico; araticum.

ABSTRACT

Dehydrated foods have been an alternative for incorporation of probiotic microorganisms. Freeze-drying is considered as an effective method to ensure the stability of probiotic microorganisms during storage. Skim milk can be used as a protective matrix for microbial cells, but it does not provide stability during storage. To achieve stability during storage, some conditions must be observed, among them: storage temperature, relative humidity and presence of oxygen. The presence of oxygen is one of the factors that contributes to the reduction of viability, leading to oxidative stress. The addition of fruits in milk-based formulations may contribute to the increase of antioxidant activity and, consequently, reduce oxidative stress and increase the viability of the microorganism. However, it is known that some compounds that have antioxidant activity may also have antimicrobial activity, and thus reduce the viability of the microorganism. **Objective:** The main objective of this study was to evaluate the effect of the addition of araticum pulp on the viability of *L. plantarum* SBR64.7 in milk-based formulations after lyophilization and during storage. **Methodology:** Skim milk was used to prepare the formulations, 10% reconstituted skimmed milk (LDR) and araticum pulp were used. The following formulations were obtained: (i) 100% LDR 10% (Control) (C); (ii) 95% LDR 10% + 5% araticum pulp (F1); (iii) 90% LDR 10% + 10% araticum pulp (F2); (iv) 85% LDR 10% + 15% araticum pulp (F3). **Results and discussion:** The addition of araticum pulp in the formulations did not significantly affect ($p>0.05$) the viability of *L. plantarum* after lyophilization. After 120 days of storage at 25°C, there was a significant reduction ($p<0.05$) in the viability of *L. plantarum* (3 logarithmic units) in the formulations added with araticum pulp. In the formulation prepared only with LDR 10%, the reduction in viability was only 1 logarithmic unit. The addition of araticum pulp significantly increased ($p<0.05$) the carbohydrate content of the formulations. There was no significant difference ($p>0.05$) between the formulations regarding antimicrobial activity against pathogens *E. coli* ATCC 25922, *Salmonella* ATCC 700623 and *S. aureus* ATCC 27726. Tolerance of *L. plantarum* was significantly ($p<0.05$) higher in gastric juice treatment, followed by intestinal juice and successive. The antioxidant activity of the formulations increased significantly ($p<0.05$) during storage. **Conclusion:** The addition of araticum pulp did not confer a protective effect on the viability of *L. plantarum* after lyophilization, but also did not cause loss of viability. However, at 120 days of storage it was observed that the addition of araticum pulp negatively affected the viability of *L. plantarum*. Further studies are needed to evaluate the effect of the addition of araticum pulp on the viability of *L. plantarum*.

Keywords: Lactic acid bacteria; survival; freeze-drying; probiotic potential; araticum.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Estabilidade de *L. plantarum* SBR 64.7 durante o armazenamento (0, 7, 14, 21, 28 e 120 dias) a 25° C..... 56
- Figura 2.** Atividade antimicrobiana das formulações liofilizadas contendo *L. plantarum* SBR 64.7 contra as bactérias *E. coli*, *S. aureus* e *Salmonella* 58

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Composição centesimal das formulações à base leite e com adição de polpa de araticum	52
Tabela 2. Viabilidade e sobrevivência de <i>L. plantarum</i> nas formulações liofilizadas durante o armazenamento	54
Tabela 3. Equações de regressão, valor R ² e erro padrão da média da viabilidade de <i>L. plantarum</i> nas formulações durante o armazenamento de 120 dias	56
Tabela 4. Viabilidade e sobrevivência de <i>L. plantarum</i> SBR 64.7 nas diferentes formulações após exposição às condições do trato gastrointestinal <i>in vitro</i>	58
Tabela 5. Atividade antioxidante de formulações liofilizadas à base de leite e com adição de polpa de araticum durante o período de armazenamento	60

LISTA DE ABREVIACÕES

ANOVA – Análise de variância

ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária

AOAC – Association of Official Agricultural Chemists

BAL – Bactérias Ácido Láticas

DNA – Ácido desoxirribonucleico

DPPH• – 2,2-difenil-1- picrilhidrazil

EFSA – European Food Safety Authority

ESI-MS – Espectrofotômetro de massa

FAO – Food and Agriculture Organization of the United Nations

FDA – Food and Drug Administration

FRAP – Poder antioxidante da redução férrica

GRAS – Geralmente considerados seguros

ICMBio – Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade

IN – Instrução Normativa

INPI – Instituto Nacional de Propriedade Intelectual

LDR – Leite desnatado reconstituído

OMS – Organização Mundial da Saúde

PUFA – Ácido graxo poli-insaturado

QPS – Presunção de segurança qualificada

RDC – Resolução da Diretoria Colegiada

RNA – Ácido ribonucleico

Tg – Temperatura de transição vítrea

TGI – Trato gastrointestinal

UFC – Unidades Formadoras de Colônias

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	14
1.1 OBJETIVOS	16
1.1.1 Objetivo geral.....	16
1.1.2 Objetivos específicos.....	16
2. REFERENCIAL TEÓRICO	17
2.1 Alimentos funcionais.....	17
2.2 Bactérias lácticas e probióticos	18
2.3. Legislação brasileira sobre a comprovação de segurança e benefícios a saúde pelo uso de probióticos.....	21
2.4. <i>L. plantarum</i> como probiótico.....	22
2.5 Liofilização de bactérias lácticas probióticas	23
2.5.1 Processo de liofilização	23
2.5.2 Fatores que afetam a viabilidade das bactérias lácticas probióticas durante a liofilização ..	25
2.5.3 Substâncias protetoras	28
2.5.4 Leite como substância protetora durante a liofilização	29
2.5.5 Fatores que afetam a viabilidade de bactérias lácticas probióticas durante o armazenamento	31
2.5.6 Reidratação de probióticos liofilizados	32
2.6 Sucos de frutas como meio de desidratação de probióticos	34
2.6.1 Frutas.....	34
2.6.2 Araticum-do-cerrado	36
2.6.3 Frutas como matriz de desidratação de probióticos	37
3. METODOLOGIA.....	40
3.1 Tipo de estudo	40
3.2 Coleta e preparo da polpa de fruta	40
3.3 Elaboração do leite desnatado reconstituído enriquecido com polpa de araticum	40
3.4 Preparo do concentrado de células de <i>L. plantarum</i>	41
3.4.1 Microrganismo e preparo da cultura estoque	41
3.4.2 Produção do concentrado de células de <i>L. plantarum</i>	4241
3.4.3 Preparo das suspensões de células nas diferentes formulações de leite suplementado com polpa de araticum	42
3.5 Liofilização das amostras	42
3.5.1 Congelamento das amostras	42
3.5.2 Liofilização.....	42
3.6 Análise da composição centesimal das formulações.....	43
3.6.1 Umidade	43

3.6.2. Proteína	43
3.6.3. Lipídio	44
3.6.4. Fibras	45
3.6.5. Carboidrato	46
3.7 Caracterização da viabilidade e sobrevivência de <i>L. plantarum</i> durante o armazenamento	46
3.7.1 Análise da viabilidade e sobrevivência	46
3.8 Sobrevivência de <i>L. plantarum</i> nas diferentes formulações liofilizadas após exposição às condições simuladas <i>in vitro</i> do trato gastrointestinal.....	47
3.9 Determinação da atividade antimicrobiana das formulações liofilizadas	49
3.10 Determinação da capacidade antioxidante	49
3.10.1 Preparo dos extratos	50
3.10.2 Determinação da capacidade de eliminação de radicais livres (DPPH•)	50
3.10.3 Determinação da capacidade redutora de ferro (FRAP).....	50
3.11 Análise estatística dos resultados	51
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	52
4.1 Composição centesimal das formulações.....	52
4.2 Viabilidade e sobrevivência de <i>L. plantarum</i> nas formulações liofilizadas durante o armazenamento	53
4.3. Viabilidade e sobrevivência de <i>L. plantarum</i> nas diferentes formulações após exposição às condições do trato gastrointestinal <i>in vitro</i>	58
4.4 Atividade antimicrobiana das formulações liofilizadas	59
4.5. Atividade antioxidante das formulações liofilizadas.....	60
5. CONCLUSÃO.....	64
6. REFERÊNCIAS	64

1. INTRODUÇÃO

É crescente o número de pessoas que tem buscado um estilo de vida natural e saudável, sendo cada vez maior o interesse dos consumidores em relação aos benefícios dos alimentos funcionais (CONGO *et al.*, 2020). Alimentos funcionais são descritos como alimentos naturais ou processados que contêm compostos biologicamente ativos (ALONGI *et al.*, 2021).

Dentre os alimentos funcionais, encontram-se os probióticos que são micro-organismos vivos que, quando administrados em quantidades adequadas, proporcionam benefícios à saúde do hospedeiro (FAO/OMS, 2001). No entanto, é essencial assegurar a determinação precisa da viabilidade dos probióticos, a fim de garantir que o produto probiótico mantém as bactérias viáveis nos alimentos, em quantidade suficiente até que atinjam o intestino e sejam capazes de exercer seus efeitos benéficos (FOGLIA *et al.*, 2020).

Para preservar a viabilidade e a funcionalidade dos probióticos a longo prazo, a indústria biotecnológica utiliza processos de secagem que envolve a transição de micro-organismos de um meio líquido para um meio sólido (LANCONELLI *et al.*, 2015). Esse processo denomina-se liofilização, que é, reconhecidamente, o melhor método de desidratação de alimentos (NOWAK *et al.*, 2020). Divide-se principalmente em 3 etapas: congelamento, sublimação e dessorção, em que o gelo e as moléculas de água ligadas são removidos através dos processos de sublimação e dessorção, respectivamente (VELLY *et al.*, 2015; CUI *et al.*, 2018).

Embora a liofilização seja o método mais recomendado para a conservação de culturas bacterianas em laboratório, a perda da viabilidade tem sido constatada durante o período de armazenamento (NOWAK *et al.*, 2020). O nível de viabilidade celular após liofilização deve-se à eficácia dos agentes protetores utilizados durante o processo de congelamento (crioprotetores) e secagem (lioprotetores) (MORGAN *et al.*, 2006).

Dentre os agentes protetores, tem-se o leite desnatado, que é um crioprotetor complexo, composto por proteínas, minerais, gorduras e açúcares essenciais à saúde humana (MARÍA *et al.*, 2021; CHALUPA-KREBZDAK *et al.*, 2018). É um importante meio de secagem, que atua diminuindo o dano celular devido a baixas temperaturas, estabilizando constituintes da membrana celular após o congelamento e durante a liofilização, além de fornecer um maior rendimento ao produto liofilizado (CARVALHO *et al.*, 2004).

Vários estudos têm demonstrado que a suplementação do leite com outras substâncias protetoras (aminoácidos, açúcar, fibras dietéticas, fruto-oligossacarídeos etc.) acentua a sobrevivência de bactérias lácticas probióticas durante o armazenamento (BASHOLLI-SALIHU *et al.*, 2014; ROMYASAMIT *et al.*, 2021; OLUWATOYIN *et al.*, 2022). Considerando que as frutas são fontes de açúcares simples e de carboidratos não-digeríveis (por

exemplo, fibras e fruto-oligossacarídeos), a utilização de frutas associado ao leite poderá acentuar a sobrevivência de probióticos durante o armazenamento.

O araticum (*Annona crassiflora*. Mart) é uma fruta típica do cerrado brasileiro, rica em nutrientes e fitoquímicos com atividade antioxidante, como carotenoides, compostos fenólicos, tocoferóis, flavonoides, vitaminas, minerais e óleos essenciais (ARRUDA *et al.*, 2019). A maioria desses compostos bioativos apresentam propriedades antioxidantes. Pensando no processo de liofilização, tais compostos poderiam proteger a membrana das células bacterianas do dano oxidativo comumente associado com processos de desidratação (BROECKX *et al.*, 2016). No entanto, sabe-se que muitos compostos bioativos, com propriedades antioxidantes, podem apresentar ação antimicrobiana e com isso comprometer a viabilidade de bactérias probióticas (ARRUDA *et al.*, 2019; SUCCI *et al.*, 2017).

Lactobacillus plantarum SBR64.7-UnB, é um potencial probiótico, que foi isolado de silagem de capim *Brachiaria* (Leandro *et al.*, 2021). No entanto, é importante que os potenciais probióticos sejam caracterizados quanto ao potencial tecnológico, antes da realização de estudos *in vivo* com animais ou humanos. Visto que, se a estirpe apresenta baixa resistência a processos tecnológicos utilizados na produção de alimentos probióticos, tal característica inviabilizará a realização dos estudos *in vivo*. A espécie *L. plantarum* é considerada tolerante a várias condições de estresse. Assim, a nossa hipótese é que a estirpe *L. plantarum* SBR64.7 apresente uma tolerância intrínseca ao processo de liofilização e que a adição de polpa de araticum poderá acentuar a viabilidade após a liofilização e proporcionar maior estabilidade durante o armazenamento a temperatura ambiente.

1.1 OBJETIVOS

1.1.1 Objetivo geral

- Avaliar o efeito da adição de polpa de araticum na viabilidade de *Lactobacillus plantarum* SBR64.7 em formulações a base de leite após a liofilização e durante o armazenamento.

1.1.2 Objetivos específicos

- Determinar a composição centesimal das formulações elaboradas com leite e diferentes percentuais de polpa de araticum;
- Analisar a sobrevivência de *L. plantarum* em diferentes formulações de leite com araticum liofilizadas durante o armazenamento e quando submetidas às condições gastrointestinais *in vitro*;
- Avaliar a atividade antimicrobiana das formulações de leite com araticum liofilizadas;
- Determinar a atividade antioxidante das formulações após a liofilização e durante o armazenamento.

2. REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Alimentos funcionais

Atualmente, um número crescente de pessoas tem buscado um estilo de vida natural e saudável, sendo cada vez maior o interesse dos consumidores em relação aos benefícios dos alimentos funcionais, bem como a percepção do impacto desses alimentos na saúde desses indivíduos (CONGO *et al.*, 2020).

O conceito de alimento mudou e a nutrição não é vista mais, como somente um meio de sustentar a vida, fornecer energia ou promover o crescimento, mas também prevenir doenças e melhorar a saúde física e mental (YE *et al.*, 2018). Nesse sentido, os alimentos funcionais têm atraído cada vez mais atenção dos consumidores por estar associada à redução do colesterol, pressão arterial, controle de peso, melhora do metabolismo, prevenção do envelhecimento, tratamento do câncer, controle do diabetes, prevenção do dano oxidativo e doenças cardiovasculares (ALONGI, *et al.*, 2021).

O termo alimentos funcional e nutracêuticos não é tão claro para a maioria dos consumidores. Segundo Maurya (2021), os nutracêuticos é um termo amplo, que pode ser compreendido como produtos alimentares que, após o consumo, fornecem benefícios nutricionais e de saúde, são considerados seguros, e geralmente não apresentam efeitos colaterais e não são tóxicos para o consumo humano. Já os alimentos funcionais são uma categoria dos nutracêuticos descritos como alimentos naturais ou processados que contêm compostos biologicamente ativos (ALONGI *et al.*, 2021). Podem ser classificados como alimentos processados, submetidos a diversos tipos de processamento, a fim de manter o valor nutricional e aumentar a vida útil dos produtos. São identificados como alimentos funcionais: alimentos que contêm minerais específicos, vitaminas, ácidos graxos insaturados, fibra dietética, alimentos com adição de substâncias bioativas como fitoquímicos ou outros antioxidantes, prebióticos e probióticos (MAURYA *et al.*, 2021).

O termo alimento funcional foi usado pela primeira vez no Japão no ano de 1980, mas sua definição é frequentemente incompreendida. (YE *et al.*, 2018). A legislação de alimentos funcionais não segue controle rígido, variando em diferentes países quanto à definição, concentração, indicação e fonte de ingredientes (MAURYA *et al.*, 2021).

Para um alimento ser considerado funcional, este deve ser validado em ensaios de intervenção para cumprir os regulamentos em cada país como, por exemplo, a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) no Brasil, a Autoridade Europeia para a Segurança

dos Alimentos (EFSA) na União Europeia e a Food and Drug Administration (FDA) nos Estados Unidos (BROWN *et al.*, 2015; CASSIDY *et al.*, 2018; MAK *et al.*, 2018).

No Brasil, a legislação não define “alimentos funcionais”. O regulamento técnico RDC nº 18, de 30/04/1999, estabelece diretrizes básicas para análise e comprovação de alimentos com alegação de propriedades funcionais e/ou alegação de propriedade de saúde.

O documento especifica que alegação de propriedade funcional é aquela relativa ao papel metabólico ou fisiológico que o nutriente ou não nutriente tem no crescimento, desenvolvimento, manutenção e outras funções normais do organismo humano. E que a alegação de propriedade de saúde é aquela que afirma, sugere ou implica a existência de relação entre o alimento ou ingrediente com doença ou condição relacionada à saúde (BRASIL, 1999).

O mercado de alimentos funcionais nos Estados Unidos, Japão e União Europeia é considerado um mercado lucrativo (PUTNIK *et al.*, 2020). A participação no mercado global de alimentos funcionais vem crescendo exponencialmente. O mercado global de alimentos funcionais crescerá de US\$ 203,64 bilhões em 2022 para US\$ 229,7 bilhões em 2023 a uma taxa composta de crescimento anual (CAGR) de 12,8% (REPORT, 2023).

Dentre os alimentos funcionais, maior atenção tem sido com a categoria de alimentos probióticos. O tamanho do mercado global de probióticos foi estimado em US\$ 54,77 bilhões em 2020 e deve aumentar para US\$ 95,25 bilhões até 2028. Além disso, projeta-se que os produtos probióticos secos sejam uma área-chave na segmentação do mercado, gerando milhões de dólares em receita nos Estados Unidos entre 2017 e 2028 (SORNSENNEE *et al.*, 2022).

Segundo Hilachuk *et al.* (2020), a tendência crescente no mercado interno de probióticos pode ser comprovada com o aumento do registro de patentes no segmento de alimentos funcionais frente ao Instituto Nacional de Propriedade Intelectual (INPI), no período de 2008 a 2020, sendo a maioria dos pedidos de patentes oriundo de probióticos (35,3%). Em contraste com outros países, as inovações no mercado de probióticos no Brasil estão surgindo principalmente de universidades, por meio de parcerias universidade-indústria e redes colaborativas orientadas à pesquisa, as quais figuram como uma forma viável de fomentar a alta capacidade de inovação na indústria de alimentos do país.

2.2 Bactérias lácticas e probióticos

Bactérias lácticas (BAL) compreendem uma ampla gama de gêneros, incluindo um número considerável de espécies. As BAL apresentam morfologia em cocos ou bacilos, não

apresentam capacidade de esporulação, são gram-positivas, usualmente catalase-negativas, crescem em condições microaerofílicas a estritamente anaeróbias (KLEIN *et al.*, 1998).

Os gêneros de maior importância para indústria de alimentos são: *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Enterococcus*, *Streptococcus*, *Weisella*, *Carnobacterium*, *Oenococcus*, *Tetragenococcus*, *Aerococcus*, *Vagococcus*, *Pediococcus* e *Bifidobacterium*, sendo o *Lactobacillus*, o gênero mais importante dentro do grupo das BAL (SZUTOWSKA *et al.*, 2021).

O gênero *Lactobacillus* foi recentemente reclassificado por cientistas em 25 gêneros. *Lactobacillus* e *Paralactobacillus* e mais 23 novos gêneros. Os vinte e três (23) novos gêneros incluem: *Amylolactobacillus*, *Acetilactobacil*, *Agrilactobacilo*, *Apilactobacilo*, *Bombilactobacilo*, *Companilactobacilo*, *Dellaglioia*, *Fructilactobacillus*, *Furfurilactobacillus*, *Holzapfelia*, *Lacticaseibacillus*, *Lactiplantibacillus*, *Lapidilactobacillus*, *Latilactobacillus*, *Lentilactobacillus*, *Levilactobacillus*, *Ligilactobacillus*, *Limosilactobacillus*, *Liquorilactobacillus*, *Loigolactobacillus*, *Paucilactobacillus*, *Schleiferilactobacillus* e *Secundilactobacillus* (ZHENG *et al.*, 2020).

Espécies pertencentes a esses gêneros são reconhecidas como “Geralmente Considerados Seguros” (GRAS) de acordo com a Food and Drug Administration (FDA/EUA), devido a sua longa história de uso seguro em alimentos fermentados e sua presença na microbiota intestinal e urogenital normal de humanos (FDA, 2018).

As BAL são quimio-organotróficas e fermentam carboidratos em ácido lático como produto final, sendo classificadas como homofermentativas obrigatórias, as quais produzem principalmente ácido lático (cerca de 90%) ou heterofermentativas, que produzem vários metabólitos, incluindo ácido lático, ácido acético, etanol e dióxido de carbono. Algumas espécies são bactérias heterofermentativas facultativas, capazes de realizar ambas as vias de fermentação (SZUTOWSKA *et al.*, 2021).

As BAL são exigentes em termos de requisitos nutricionais para crescimento e desempenho (FDA, 2020). A maioria das BAL obtém energia somente a partir do metabolismo de açúcares, estando normalmente restritas a habitats onde haja presença desse nutriente. Devido às suas complexas necessidades nutricionais para o crescimento, as BAL ocorrem mais frequentemente em ambientes ricos em carboidratos, aminoácidos, vitaminas ou ácidos graxos. Além disso, possuem um conjunto único de enzimas que permite metabolizar vários compostos encontrados em matrizes vegetais. Isso pode implicar aumento ou diminuição da biodisponibilidade de compostos bioativos, atividade antioxidante e conteúdo de compostos fenólicos ou vitaminas (KURT *et al.*, 2019).

Os lactobacilos são nativos de muitos habitats diferentes, como plantas, silagem, carne, leite e solo. Eles também podem ser encontrados em abundância na cavidade oral, trato intestinal e urogenital humano (FDA, 2020).

De acordo com Kotharia *et al.* (2019), os probióticos abrangem tanto bactérias (*Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus*, *Propionibacterium*, *Bifidobacterium*, *Bacillus*, alguns *Streptococcus*, *Enterococcus*, *Escherichia coli*) quanto leveduras (*Saccharomyces*). Os sete principais gêneros de micro-organismos mais empregados em alimentos probióticos são *Lactobacillus*, *Bifidobacterium*, *Saccharomyces*, *Streptococcus*, *Enterococcus*, *Escherichia* e *Bacillus* (CHAUDHARY *et al.*, 2023).

Probióticos são micro-organismos vivos que, quando administrados em quantidades adequadas, proporcionam benefícios à saúde do hospedeiro (FAO/OMS, 2001). Para alcançar os benefícios a saúde é recomendada a ingestão diária do produto probiótico contendo entre 10^6 a 10^8 UFC / g produto (SERTOVIC *et al.*, 2019). A fim de exercer a atividade probiótica, os micro-organismos vivos devem estar presentes em quantidade adequada, resistir às condições adversas da digestão e atingir o intestino em quantidade suficiente para se desenvolver e promover efetivamente os benefícios ao hospedeiro (RIBEIRO *et al.*, 2020; SAVEDBOWORN *et al.*, 2020).

Os probióticos são utilizados para melhorar o equilíbrio micro ecológico em várias partes do organismo, particularmente no TGI (WANG *et al.*, 2022). Normalmente, a microbiota intestinal humana contém 10^{13} - 10^{14} micro-organismos, tornando um dos ecossistemas mais complexos da natureza. Anteriormente, acreditava-se que os micro-organismos intestinais eram dez vezes o número de células encontradas em humanos, no entanto pesquisas recentes mostraram que o número de micro-organismos e de células humanas é igual (CHAUDHARY *et al.*, 2023).

Devido às suas excelentes propriedades e valor clínico, os probióticos são atualmente administrados como suplementos dietéticos e como ingredientes alimentares (FDA, 2020). Os benefícios advindos do consumo de probióticos dependem da viabilidade da estirpe durante a produção, armazenamento e consumo, das propriedades específicas de cada estirpe, da composição química da matriz do alimento, das condições e tempo de estocagem, dentre outros fatores (SADY *et al.*, 2017).

Os probióticos conferem efeitos benéficos à saúde por meio de diferentes mecanismos que envolvem uma ampla gama de compostos bioativos. Os mecanismos de ação dos probióticos incluem inibição competitiva da multiplicação de bactérias patogênicas pela alteração do pH e redução da disponibilidade de oxigênio, levando a condições intestinais

menos favoráveis. Inibição não competitiva pela produção de bacteriocinas, síntese de micronutrientes essenciais como vitaminas, aminoácidos e enzimas, aumento da biodisponibilidade de nutrientes dietéticos, estímulo do sistema imunológico do hospedeiro e aumento da atividade metabólica dos carboidratos (KHANEGHAH *et al.*, 2020).

Tais mecanismos são importantes durante a associação simbiótica de probióticos com a microbiota intestinal e seu hospedeiro. Tal associação, dependendo da estirpe de micro-organismo probiótico, poderá proporcionar alguns benefícios, tais como: prevenção de doenças como gastroenterites, diarreia associada ao uso de antibiótico, doença inflamatória intestinal, doença celíaca, redução dos sintomas associados a intolerância à lactose e outros benefícios (STAVROPOULOU & BEZIRTZOGLU, 2020).

2.3. Legislação brasileira sobre a comprovação de segurança e benefícios a saúde pelo uso de probióticos

No Brasil, a RDC n° 241, de 26/07/2018, dispõe que o uso de probióticos em alimentos requer: comprovação de segurança e benefícios à saúde; caracterização e identificação inequívoca da linhagem do micro-organismo, por meio da apresentação de documentos técnicos ou estudos científicos que: (i) identifiquem a espécie, de acordo com a nomenclatura binomial mais atual; (ii) identifiquem e caracterizem a linhagem, por meio de métodos genotípicos e fenotípicos; (iii) especifiquem a origem da linhagem; (iv) comprovem o depósito da linhagem em uma coleção de cultura internacionalmente reconhecida.

A comprovação da segurança deve ser realizada por meio de documentos técnico ou estudos científicos que demonstrem: (i) histórico de uso seguro; (ii) ausência de registros de eventos adversos relevantes, obtidos a partir de estudos clínicos ou vigilância pós-uso; (iii) ausência de fatores de virulência e patogenicidade relevantes para a saúde humana; (iv) ausência de produção de substâncias ou metabólitos que representem risco à saúde humana; (v) ausência de resistência potencialmente transferível a antibióticos relevantes para a saúde e (vi) susceptibilidade a, pelo menos, dois antibióticos.

Além disso, quando os probióticos não forem isolados de alimentos ou da microbiota indígena humana e não tiverem sua segurança estabelecida em nível de gênero ou espécie, a segurança deve ser comprovada por meio dos seguintes estudos: (i) genotoxicidade e mutagenicidade; (ii) toxicidade aguda, subcrônica e a longo prazo; (iii) toxicidade reprodutiva e no desenvolvimento, quando a linhagem for destinada a crianças menores de três anos e gestantes.

Segundo a resolução, o benefício alegado pode ter caráter geral ou específico, levando em consideração a totalidade e o nível das evidências disponíveis. A comprovação do benefício para probióticos requer demonstração da sobrevivência às condições do trato digestório humano e evidência de efeito em humanos obtida por meio de estudos clínicos robustos (BRASIL, 2018).

As Instruções Normativas, por sua vez (IN n° 76, de 05/11/20 e IN n° 102, de 15/10/21) estabelecem limites mínimos de probióticos e acrescenta e/ou altera os limites mínimos, que devem ser fornecidos em suplementos alimentares. Além disso, nessa Instrução Normativa é apresentada a lista de probióticos autorizados no Brasil.

2.4. *L. plantarum* como probiótico

Dentre o considerável número de espécies, tem-se o *L. plantarum* que é uma bactéria láctica versátil, gram-positiva, descoberta originalmente na saliva e presente em uma grande variedade de nichos ecológicos (CARPI *et al.*, 2021).

L. plantarum é um lactobacilo heterofermentativo facultativo, que a depender da fonte de carbono, podem mudar de formas de metabolismo heterofermentativas e homofermentativas. Fermenta hexose e pentose para produzir ácidos orgânicos, como ácido acético, ácido succínico, ácido lático, etanol ou dióxido de carbono, como principais metabólitos sob condições específicas e substratos seletivos (LIU *et al.*, 2018; ABDELAZEZ *et al.*, 2018).

Possui o maior genoma conhecido entre as BAL (~3,3 Mb). É uma espécie que pode ser isolada em diferentes fontes, de fácil cultivo em laboratório, tornando-o altamente interessante para pesquisadores na indústria de alimentos. O habitat natural do *L. plantarum* foi amplamente distribuído, especialmente em produtos vegetais e animais fermentados, podendo também ser isolado em produtos lácteos fermentados, pães e outros produtos alimentícios fermentados como kimchi, chucrute, pickles ou azeitonas (SZUTOWSKA *et al.*, 2021; FDA, 2020).

Essa notável adaptação do *L. plantarum* a diferentes nichos ecológicos reflete sua capacidade de fermentar uma ampla gama de carboidratos, incluindo monossacarídeos, dissacarídeos e polissacarídeos. Produz catalases, peroxidases e redutases para lidar com o estresse oxidativo, bem como uma concentração intracelular de íons de manganês [Mn²⁺] para eliminar radicais de oxigênio. Possui também, atividade tanase e são capazes de metabolizar ácidos fenólicos (ABDELAZEZ *et al.*, 2018).

Mudanças taxonômicas recentes no gênero *Lactobacillus*, ocasionou a modificação na nomenclatura do microrganismo de *Lactobacillus plantarum* para *Lactiplantibacillus*

plantarum (ZHENG *et al.*, 2020). *Lactiplantibacillus plantarum* é listada com status “geralmente reconhecido como seguro (GRAS) e tem uma Presunção de Segurança Qualificada (QPS), pela Autoridade Europeia para a Segurança dos Alimentos – EFSA (ECHEGERAY *et al.*, 2022; FDA, 2020).

Segundo a FDA, (2020) a estirpe *L. plantarum* DSM 33452 não contém nenhum gene de resistência a antibióticos e é considerado seguro para uso na fabricação de alimentos, probióticos e suplementos dietéticos para consumo humano.

Embora, tradicionalmente, seja usada para fermentação de laticínios, carnes e vegetais, vem ganhando importância crescente como probiótico (LIU *et al.*, 2018). Estirpes de *L. plantarum* podem ser caracterizadas por inúmeras propriedades probióticas, como redução da atividade do colesterol, prevenção da diarreia ou controle de distúrbios gastrointestinais (SZUTOWSKA *et al.*, 2021), tolerância ao TGI, capacidade de adesão à mucosa intestinal, propriedades antioxidantes e antibacterianas (ECHEGERAY *et al.*, 2022).

Além disso, estudos recentes demonstraram que *L. plantarum* possui propriedades clínicas benéficas, melhorando a disbiose, presente em diversas condições de obesidade, disfunção cognitiva e depressão (WANG *et al.*, 2022).

Leandro *et al.* (2020) isolou a estirpe *Lactobacillus plantarum* de silagem de capim *Brachiaria*. Vários testes *in vitro* foram realizados para caracterizar o seu potencial probiótico, e os resultados obtidos foram bastante promissores em relação ao potencial probiótico. No entanto, ainda não foi avaliado o potencial tecnológico desta estirpe.

2.5 Liofilização de bactérias lácticas probióticas

2.5.1 Processo de liofilização

A liofilização inclui três etapas importantes: congelamento, secagem primária e secagem secundária (WANG *et al.*, 2022). A liofilização é a combinação de dois processos igualmente importantes: (1) congelamento, em que a maior parte do solvente, até 95%, é convertida em um sólido congelado; e (2) secagem, em que quase todo o solvente – congelado e descongelado – é removido da formulação. O processo de secagem consiste em 2 etapas: (1) sublimação ou secagem primária e (2) dessorção ou secagem secundária (ASSEGEHEGN *et al.*, 2019).

O congelamento é a primeira operação antes da liofilização. É uma etapa crítica porque o alimento ou micro-organismo pode sofrer danos e, a depender do grau do dano gerado no alimento, poderá impactar todo o processo da liofilização. Nesta etapa, a maior parte da água é

convertida em sólido, formando uma rede de cristais de gelo, caracterizada por tamanho, morfologia e distribuição do cristal de gelo, a qual influencia vários parâmetros críticos como: resistência do produto seco, taxa de secagem primária, taxa de secagem secundária, extensão da cristalinidade do produto, área de superfície específica e reconstituição do produto seco (BELLALI *et al.*, 2020).

O processo de congelamento se divide em 3 estágios: (1) estágio de resfriamento, em que a formulação líquida é resfriada da temperatura inicial até a temperatura do ponto de congelamento; (2) fase de estágio de mudança, em que a formação do primeiro núcleo de gelo e o crescimento do cristal de gelo está ocorrendo e (3) estágio de solidificação em que todos os cristais de gelo já estão formados (ASSEGEHEGN *et al.*, 2019).

A água disponível nos produtos pode estar sob a forma livre ou ligada à matriz por várias forças. A água livre congela, mas a água ligada não congela. É importante que toda água livre e alguma água ligada seja removida, o que torna a liofilização um processo altamente complexo (NOWAK *et al.*, 2020).

Durante a fase de resfriamento, a temperatura da formulação diminui, formando o primeiro núcleo de gelo, num processo denominado nucleação primária, que ocorre à temperatura de nucleação. A formação de cristais de gelo é um processo exotérmico, em que o calor emitido deve ser removido, para que o processo possa continuar. A quantidade de calor absorvida durante nucleação secundária determina o número total de cristais de gelo formado. Um maior grau de super-resfriamento leva a uma maior quantidade de água para cristalizar durante a nucleação secundária. Uma taxa mais rápida de congelamento leva a diversos locais de nucleação secundária, produzindo muitos pequenos cristais de gelo. Em contraste, quanto menor for a quantidade de água para ser cristalizada durante a nucleação secundária, menores serão os cristais de gelo formados (ASSEGEHEGN *et al.*, 2019).

Durante a solidificação, os cristais de gelo crescem, reduzem a disponibilidade de água líquida e aumentam a concentração de soluto na formulação, que é referida como concentração por congelamento. Ao continuar o resfriamento, a concentração de soluto aumenta para uma concentração crítica, acima da qual a solução concentrada sofre congelamento eutético ou vitrificação (ASSEGEHEGN *et al.*, 2019).

A secagem primária é a etapa da liofilização em que ocorre o processo de sublimação do gelo em vapor de água, na maioria das vezes à pressão reduzida. Durante a sublimação, a quantidade de calor fornecida deve corresponder à quantidade de calor necessária para a sublimação do gelo. O processo de sublimação ocorre a partir da superfície do produto durante

a redução da pressão no liofilizador. A pressão na câmara do liofilizador deve estar abaixo de 610 Pa (pressão do ponto triplo aproximada da água) (MORGAN *et al.*, 2006).

A secagem secundária ou dessorção é a remoção da água ligada que está retida dentro da matriz e ocorre após toda a água livre congelada ter sido sublimada. A água ligada pode levar maior tempo para ser removida. O ponto final da secagem secundária é geralmente determinado pela análise da umidade residual remanescente no interior do produto liofilizado (MORGAN *et al.*, 2006).

Segundo Nowak *et al.* (2020), a secagem secundária ou dessorção ocorre sob pressão reduzida, com o aquecimento simultâneo do produto até alcançar o teor de água determinado individualmente para cada matéria-prima. Nesta fase, a taxa de secagem é significativamente reduzida em comparação ao processo de sublimação. A duração da secagem secundária pode demandar maior tempo, caso o teor de umidade do produto final seja baixo. Presume-se que o teor de matéria seca de equilíbrio final deve ser superior a 95%. A taxa de dessorção é fortemente dependente da temperatura. A temperatura de aquecimento deve ser inferior à temperatura máxima permitida para o material, devido à possibilidade de degradação térmica e transição para o estado de encolhimento. A temperatura máxima permitida para produtos alimentícios (frutas e vegetais) varia entre 60-70°C, devendo estar sempre abaixo da temperatura de transição vítrea.

Temperatura de transição vítrea (T_g) é definida como a temperatura em que o material na fase amorfa se transforma do estado vítreo (duro) para o estado de borracha (elástico). Essa temperatura é afetada pelo conteúdo de umidade, peso molecular e estrutura química do material. T_g deve ser 10° a 20° C maior que a temperatura de armazenamento do produto liofilizado (MISRA *et al.*, 2021).

2.5.2 Fatores que afetam a viabilidade das bactérias lácticas probióticas durante a liofilização

Embora a liofilização seja o método mais recomendado para a conservação de culturas bacterianas em laboratório, a perda da viabilidade tem sido constatada durante o período de armazenamento. A etapa de congelamento é apontada como a principal causa da perda da viabilidade de culturas submetidas à liofilização. O processo de congelamento e a taxa de congelamento podem ser prejudiciais à viabilidade de uma célula bacteriana após secagem. O nível de viabilidade celular após liofilização é atribuído a fatores importantes como: o tipo de micro-organismo e a eficácia dos agentes protetores utilizadas, durante o processo de congelamento e secagem na liofilização (MORGAN *et al.*, 2006).

Os danos causados em sistemas biológicos por processos de secagem são atribuídos à desnaturação de componentes do DNA e RNA, mudança no estado físico e na estrutura de proteínas da membrana lipoproteica (GUERGOLETTTO, 2012).

O efeito adverso do oxigênio é atribuído a danos à parede celular, membrana celular e DNA da bactéria, bem como oxidação dos lipídios da membrana durante a secagem e armazenamento, os quais podem causar perdas de viabilidade (KURTMANN *et al.*, 2009). A perda de viabilidade durante o armazenamento está sujeita a um fenômeno de auto oxidação, que encontra sua origem pelo efeito combinado de temperatura e oxidação de constituintes dos ácidos graxos insaturados, presentes na membrana celular, que ao serem oxidados criam radicais livres, os quais são substâncias tóxicas que levam à ruptura da membrana e, portanto, à morte celular no futuro (COULIBALY *et al.*, 2009).

Esses danos são causados pela oxidação lipídica, que favorece o aumento da proporção entre os ácidos graxos saturados, provocando um aumento da temperatura de transição, com consequente redução da fluidez da membrana até uma determinada temperatura e a um aumento do vazamento da enzima intracelular lactato desidrogenase (LDH), o qual tem sido correlacionado com a sobrevivência após a secagem. Além disso, sabe-se que a consequência de um grande número de oxidações biológicas resulta na formação de radicais livres e que estes podem reduzir a hidrofobicidade dos ácidos graxos, devido à introdução de grupos hidrofílicos e, assim, enfraquecer a interação hidrofóbica com as proteínas da membrana, que podem ser essenciais para sua atividade (HANSEN *et al.*, 2015; GUERGOLETTTO, 2012).

A oxidação da membrana lipídica é tida como uma causa de perda de viabilidade durante a liofilização. Os ácidos graxos insaturados são propensos à oxidação, o que pode alterar as propriedades físicas e químicas da membrana e, assim, diminuir a viabilidade bacteriana. Bactérias com PUFA na membrana lipídica são mais sensíveis ao oxigênio e sofrem maior perda de viabilidade do que as bactérias com apenas ácidos graxos monoinsaturados e saturados (HANSEN *et al.*, 2015).

No processo de liofilização, fosfolipídios da membrana podem sofrer transição de fase líquida-cristalina para uma fase de gel. Após a reidratação, os lipídios retornam à fase líquida cristalina, mas não simultaneamente. A coexistência de ambas as fases pode causar a separação da fase lipídica lateral, levando a vazamento do espaço intracelular (HANSEN *et al.*, 2015).

A espécie *L. plantarum* é caracterizada por ter baixo grau de perda de viabilidade durante a secagem, dando origem a uma pequena quantidade de vazamento de LDH. Estirpes distintas da mesma espécie podem diferir seu comportamento durante a secagem e armazenamento, devido a diferenças na constituição genética que podem levar a diferenças nos

fenótipos de variadas estirpes, diferenças na parede celular e composição da membrana, apresentando pontos de fusão diferentes nos fosfolipídios, os quais podem causar diferenças entre as estirpes. (HANSEN *et al.*, 2015; CARVALHO *et al.*, 2004).

Diversos fatores são responsáveis por reduzirem a viabilidade dos probióticos, incluindo fatores intrínsecos como: acidez da matriz vegetal, nível de oxigênio nos produtos, presença de outras bactérias lácticas, atividade de água, presença de sal, açúcar, aromatizantes e corantes artificiais. Além de parâmetros inerentes ao processamento como condições de temperatura e armazenamento, composição do material de embalagem associado a parâmetros microbiológicos, como tipo de estirpe, taxa e proporção de inoculação relativa ao probiótico (RAVINDRAN, 2020).

No entanto, pretende-se com a utilização do araticum, o qual é fonte de compostos bioativos, com atividade antioxidante, combater o processo oxidativo atuando como eliminador de radicais livres, inibidor de peroxidação lipídica e quelante de metais, sendo um possível agente de proteção da estirpe *L.plantarum* SBR 64 -7 (MARNPNAE *et al.*, 2022).

Segundo Jouki *et al* (2021), a formação de cristais de gelo, danos à membrana, alta osmolaridade, desnaturação de macromoléculas nas células e remoção da água são as razões mais importantes para a perda da viabilidade do probiótico. Portanto, a adição de protetores pode aumentar a estabilidade e sobrevivência de bactérias probióticas.

No estudo de Wang *et al.* (2019), observou-se a combinação de crioprotetores (12,5 g / L de trealose, 12,5 g / L de sacarose, 37,5 g / L de glicerol e 25,0 g / L de leite desnatado), sendo essa combinação considerada o crioprotetor ideal para *L. plantarum*, obtendo taxa de sobrevivência de 92,8% para *L. plantarum* e 91,2% para *L. casei*, após o congelamento.

Araújo *et al.* (2020), estudou o potencial das frutas acerola, caju e goiaba em frear o estresse sofrido pelos micro-organismos durante a liofilização, por meio de matrizes simples e complexas encontradas em coprodutos de frutas tropicais, como fibras alimentares com propriedades prebióticas (fruto-oligossacarídeos, inulina e rafinose) e constatou que houve proteção das culturas bacterianas (*Lactobacillus paracasei* L-10, *Lactobacillus casei* L-26 e *Lactobacillus acidophilus* LA-05), contra os efeitos danosos da desidratação na membrana celular. No entanto, esses efeitos protetores mostraram não ser dependentes apenas das características físico-químicas dos compostos protetores, mas também da sensibilidade intrínseca das estirpes estudadas.

O processo de liofilização necessita de controle da taxa de congelamento, nível de temperatura, pressão total do gás, bem como do teor médio de umidade necessários, para que seja obtido um produto liofilizado com qualidade adequada (NOWAK *et al.*, 2020).

Apesar das inúmeras vantagens microbiológicas e da alta qualidade dos produtos em relação a outros métodos, a liofilização é sempre considerada um processo de desidratação lento e mais caro, além de ser visto como menos favorável à produção de grandes massas de células secas (GUERGOLETTTO, 2012).

A seleção das condições adequadas para a liofilização de um material alimentício deve ser realizada com base nas características das matérias-primas, como teor de água, presença de açúcares, proteínas, compostos bioativos, tipo de material (tecido, material líquido, material semilíquido, gel) e temperatura de transição vítrea dos alimentos. A estrutura porosa dos produtos secos pode afetar os descritores de cor, especialmente a luminosidade do material devido à presença de poros e vazios de ar. Mudanças na cor dos alimentos desidratados podem ser um indicador da temperatura térmica indesejada na degradação de muitos compostos bioativos, como antioxidantes (NOWAK *et al.*, 2020).

2.5.3 Substâncias protetoras

A liofilização combina tensões de congelamento e secagem que são conhecidos por serem mais prejudiciais às bactérias sensíveis ao congelamento. Antes do processo de liofilização, as suspensões bacterianas precisam ser primeiramente congeladas e posteriormente desidratadas, sob vácuo. No entanto, sem uma proteção adequada, a liofilização danifica gravemente a membrana celular e proteínas, causando uma diminuição na viabilidade das células (BELLALI *et al.*, 2020).

A fim de conter as tensões desenvolvidas ao longo do processo de liofilização, utilizam-se soluções estabilizadoras, as quais são substâncias inertes que visam aumentar a estabilidade durante a liofilização e melhorar a estabilidade física e química do produto durante o armazenamento. Tais soluções podem ser do tipo crioprotetoras, as quais protegem as células de lesão durante o congelamento e/ou lioprotetoras, as quais protegem as células de lesão durante a etapa de secagem, devendo ser adicionadas às células antes do congelamento, para que seja minimizada a formação de cristais de gelo e que mudanças biofísicas e bioquímicas não causem a morte celular (MOHAMMADY *et al.*, 2020; MARÍA *et al.*, 2021).

A eficácia da liofilização está diretamente relacionada ao tipo de crioprotetor utilizado (ARELLANO-AYALA *et al.*, 2021). Crioprotetores de baixo peso molecular são em sua maioria açúcares (trealose, lactose, glicose, lactulose, sorbitol e manose) que reagem com os fosfolípidos presentes na parede celular e previnem danos celulares. Crioprotetores de alto peso molecular como polissacarídeos e polipeptídeos (proteína do soro do leite, caseína, alginato,

gelatina, maltodextrina) adsorvem à superfície dos micro-organismos e desenvolvem uma camada viscosa que resiste à penetração de cristais de gelo. Lioprotetores, principalmente dissacarídeos, mantêm a estabilidade da membrana dos micro-organismos durante o processo de secagem (HATHI *et al.*, 2021).

Segundo Carvalho *et al.* (2004), o leite em pó desnatado é um importante meio de secagem porque previne lesão celular ao estabilizar constituintes da membrana celular; cria uma estrutura porosa no produto liofilizado, que torna a reidratação mais fácil, além de conter proteínas que fornecem um revestimento protetor às células. Outra característica do leite desnatado é sua capacidade de secar mais facilmente e fornecer um maior rendimento ao produto liofilizado.

Segundo Bellali *et al.* (2020), a adição de leite desnatado à mistura de trealose e sacarose propicia uma maior taxa de sobrevivência durante o armazenamento e a mistura de outros componentes ao meio protetor como sacarose + trealose; sacarose + trealose + leite desnatado pode resultar em uma melhor proteção ao microrganismo, ao invés de um único componente devido aos efeitos protetores aditivos ou sinérgicos.

2.5.4 Leite como substância protetora durante a liofilização

A matriz do leite é de grande complexidade, sendo formada por aproximadamente cem mil constituintes distintos. Devido à sua composição química e à sua micro e nanoestrutura, pode-se definir o leite como um material complexo, no qual há uma emulsão de gordura e uma dispersão coloidal de proteínas (caseína, proteína do soro do leite) em uma solução aquosa de sais, vitaminas, peptídeos e lactose (ZHENG *et al.*, 2015; TOLEDO *et al.*, 2020).

Leite em pó é o produto obtido por desidratação do leite de vaca, integral, desnatado ou parcialmente desnatado e apto para a alimentação humana, mediante processos tecnologicamente adequados, devendo o leite desnatado conter em sua formulação teores menores ou iguais a 1,5% de gordura por 100 g do produto (BRASIL, 2018).

O leite desnatado diminui o dano celular diante das baixas temperaturas, após o congelamento e durante a liofilização. A utilização do leite desnatado tem efeito positivo, já que evita a redução da viabilidade celular, protegendo as células durante a liofilização, através de uma camada viscosa, resultante das proteínas do leite na superfície das células e como estabilizante da membrana. Portanto, grupos hidroxila ou amino podem substituir a água nas moléculas de proteína e lipídios da membrana (HAMEED *et al.*, 2021).

De acordo com Arellano-Ayala *et al.* (2021), o componente proteico do leite desnatado é o responsável por estabilizar os constituintes da membrana celular e fornecer um revestimento

de proteção às células durante a liofilização, enquanto os aminoácidos reagem com grupos carboxila das proteínas bacterianas, estabilizando, pois, a sua estrutura.

Segundo Sornseen *et al.* (2022), a proteína do leite desnatado é um composto crioprotetor não permeável, que melhora a preservação de bactérias. Após a liofilização, a concentração ótima de leite desnatado (10% p/v) preservou efetivamente a viabilidade dos probióticos (>90%) em espécies de *Enterococcus faecalis* e *Lacticaseibacillus*, como *L. fermentum*, *L. rhamnosus*, *L. casei* e *L. paracasei* e no armazenamento a longo prazo (1 ano), o leite desnatado (10% p/v) manteve 70% de sobrevivência de *L. fermentum*.

No entanto, segundo o estudo de María *et al.* (2021) foram utilizados crioprotetores separadamente como maltose, trealose, glicerol, leite desnatado, bem como sua combinação com dissacarídeos (maltose e trehalose); com poliálcool (sorbitol) e com NaCl, sendo constatado que, apesar de o leite desnatado ser o crioprotetor mais frequentemente utilizado no processo de liofilização, a utilização desse crioprotetor sozinho demonstrou a maior redução de viabilidade do micro-organismo *K. phaffii* (*P. pastoris*). Os dissacarídeos permitiram melhor proteção celular do que suas respectivas combinações com leite desnatado e que a combinação do leite desnatado com o sorbitol mostrou o melhor efeito protetor e uma porcentagem maior de sobrevivência do micro-organismo, devido à proteção da membrana, prevenção da oxidação lipídica, estabilização das estruturas proteicas e manutenção do turgor celular.

O leite desnatado é tido como um crioprotetor complexo, por conter uma mistura de macromoléculas como lactalbumina e caseína, que atuam como agentes de volume, protegendo a célula do meio externo, enquanto os sacarídeos como lactose, previnem a desnaturação das proteínas celulares durante o resfriamento (penetração parcial das células) (MARÍA *et al.*, 2021).

O efeito crioprotetor do leite desnatado deve-se, também, em grande parte à lactose, já que o açúcar do leite atua como agente desidratante, reduzindo a quantidade de água intracelular (JAGANNATH *et al.*, 2010). No entanto, segundo Zhenh *et al.* (2015), o efeito protetor do leite desnatado reconstituído deve-se em sua maior parte ao cálcio e às proteínas do leite, ao invés da lactose.

De acordo com o trabalho de Zhenh *et al.* (2015), a lactose pura não demonstrou muita proteção às BAL em alta temperatura, indicando que a maior estabilidade ao calor pode ter como causa principal outros componentes como cátions divalentes (Ca^{2+} e Mg^{2+}). O leite desnatado contém Ca^{2+} abundante, que pode proteger as células contra o estresse por calor de duas maneiras: estabilização das estruturas celulares (membrana citoplasmática) sob estresse térmico e combinação com as proteínas do leite para formar aglomerados com células das BAL,

amortecendo as tensões causadas pela rápida desidratação e elevação da temperatura. Já o Mg^{2+} é outro estabilizador de calor, que atua estabilizando ribossomos bacterianos sob estresse térmico excessivo.

Cada meio protetor impacta micro-organismos de forma diferente e não há ainda meio protetor universal (BELLALI *et al.*, 2021). De acordo com o estudo de Zhenh *et al.* (2015), o efeito protetor do leite desnatado reconstituído deve-se em sua maior parte ao cálcio e às proteínas do leite, ao invés da lactose, o que pode ser demonstrado quando BAL desidratadas no leite integral reconstituído apresentou uma maior perda de viabilidade, com temperatura de transição em torno de 60° C, em contraste com a temperatura de 65-70° C em meio contendo lactose e MRS e a temperatura de 75° C em leite desnatado reconstituído. Os efeitos prejudiciais podem ser devido ao alto teor de gordura do leite integral, o qual pode não controlar a estabilidade ao calor das células de BAL, prejudicando o processo de desidratação, além de favorecer a oxidação e afetar a viabilidade dos micro-organismos.

2.5.5 Fatores que afetam a viabilidade de bactérias lácticas probióticas durante o armazenamento

A viabilidade de probióticos refere-se a presença de micro-organismos vivos no momento do consumo e é considerada essencial para a eficácia do produto. Logo, a determinação precisa da viabilidade é de fundamental importância para assegurar que o produto probiótico mantém as bactérias viáveis nos alimentos, em quantidade suficiente até que atinjam o intestino e sejam capazes de exercer seus efeitos benéficos (FOGLIA *et al.*, 2020).

Segundo Arellano-Ayala *et al.* (2021), a viabilidade das células bacterianas será reduzida quando sujeita a tensões subletais como variações de pH, baixa temperatura, formação de cristais de gelo ocasionadas durante o processo de congelamento.

As condições de armazenamento são críticas para a recuperação de micro-organismos liofilizados, devendo os probióticos desidratados serem armazenados sob vácuo, mantidos em atividade de água controlada e serem protegidos da luz (CARVALHO *et al.*, 2004).

A atividade de água e a temperatura de armazenamento são os principais fatores que afetam a estabilidade probiótica ao longo da vida útil do produto. Logo, prevenir a entrada de umidade é essencial para manter uma contagem de células probióticas viáveis (KURT *et al.*, 2019).

O conteúdo de umidade revela a ineficiência do processo de liofilização na remoção completa de umidade, que é um parâmetro importante, já que influencia a atividade de água e, portanto, a estabilização do produto (MONTEIRO *et al.*, 2020).

A viabilidade dos probióticos é dependente de múltiplos fatores como nível de oxigênio no produto, permeabilidade de oxigênio na embalagem, tempo de fermentação e temperatura de armazenamento (TAYO *et al.*, 2016). Vários fatores presentes na matriz alimentar influenciam a viabilidade probiótica incluindo acidez, produção de peróxido de hidrogênio, concentração de açúcares (estresse osmótico), atividade de água (Aw) e metabólitos (CHAMPAGNE *et al.*, 2011).

Lascano *et al.* (2020), estudou a viabilidade de *L. plantarum* em suco de maracujá desidratado por pulverização. O produto foi armazenado em diferentes temperaturas (4° C, 25° C e 37° C) e avaliado quanto a viabilidade durante 4 semanas. O produto armazenado a 4° C apresentou o maior percentual de sobrevivência (91,63%) em comparação às demais condições de armazenamento.

Barbosa *et al.* (2015) avaliaram a sobrevivência de *L. plantarum* 299v. e *Pediococcus acidilactici* HA6111-2 em suco de laranja desidratado pelos métodos de secagem *spray drying*, secagem por convecção e liofilização. Observaram que as duas estirpes apresentaram maior sobrevivência aos processos de liofilização e *spray drying*. O número de células viáveis foi de cerca de 10⁴ UFC / g para a secagem por convecção, enquanto que para secagem por *spray drying* e liofilização foi superior a 10⁸ UFC/g. A estirpe *L. plantarum* 299v apresentou menor perda de viabilidade em comparação a *Pediococcus acidilactici* HA6111-2 quando foi armazenada por 180 dias a 4°C e 25°C.

De acordo com Rascón *et al.* (2017), a atividade de água (Aw = 0,327) foi considerado um fator crítico para a sobrevivência do *L. rhamnosus* durante o armazenamento da banana desidratada suplementada com *L. rhamnosus*. A baixa atividade de água (0,115-0,327) das bananas desidratadas foi considerado o fator responsável por manter a viabilidade de *L. rhamnosus*. Com 20 a 28 dias de armazenamento foi observada uma estabilidade da viabilidade de *L. rhamnosus* quando a atividade de água da banana desidratada apresentou um valor de 0,327.

2.5.6 Reidratação de probióticos liofilizados

Bactérias liofilizadas sofrem danos celulares em todas as etapas do processo e, como resultado, as condições de reidratação dessas células terão uma importante influência na recuperação da viabilidade, e consequentemente na contagem dos micro-organismos (CHAMPAGNE *et al.*, 2011). A viabilidade dos micro-organismos liofilizados pode ser afetada durante e após a reidratação (ARELLANO-AYALA *et al.*, 2021).

Um micro-organismo que sobrevive às várias etapas de congelamento, desidratação e armazenamento pode, no entanto, perder sua viabilidade durante a etapa de reidratação. Logo, a reidratação é um fator crítico na etapa de recuperação de micro-organismos liofilizados, já que as células que foram submetidas a um dano subletal podem não ser capazes de reparar o dano, caso elas sejam reidratadas sob condições inadequadas (CARVALHO *et al.*, 2004).

Por outro lado, diversos fatores estão envolvidos na sobrevivência das células bacterianas como: resistência intrínseca à estirpe, concentração inicial de células, densidade celular, condições de crescimento, fase de crescimento e tipos de crioprotetores utilizados durante a liofilização (ARELLANO-AYALA *et al.*, 2021).

Por se tratar de uma etapa sensível, a reidratação de células liofilizadas deve ser realizada com solução tampão, em um pH próximo ao pH ótimo das estirpes (NUALKAEKUL *et al.*, 2012). De acordo com Arellano-Ayala *et al.* (2021), uma reidratação inadequada pode acarretar em células injuriadas, com baixa viabilidade e reduzida taxa de sobrevivência, sendo essencial fornecer um ambiente adequado, verificar a compatibilidade da estirpe e sua adaptabilidade à solução de reconstituição, a fim de recuperar sua funcionalidade. Logo, fatores como composição, níveis de sólidos, pH e nível de potencial redox dos ingredientes presentes na solução de reconstituição devem ser controlados durante a reidratação.

Durante o processo de reidratação, as células são submetidas a uma rápida mudança nas condições físico-químicas, em que a viabilidade do micro-organismo liofilizado pode ser comprometida pelo choque osmótico, que é um dos principais efeitos prejudiciais à reconstituição de uma cultura liofilizada. Outros fatores que afetam a viabilidade durante a reidratação são: a composição da solução de reidratação, a osmolaridade, relação de volume / taxa de reidratação, o tempo, a temperatura e o tipo de micro-organismo (ARELLANO-AYALA *et al.*, 2021).

De acordo com Leach *et al.* (1959), a relação de volume / taxa de reidratação adequada é importante para reter a integridade funcional e estrutural do micro-organismo, já que, em poucos segundos, as células mudam rapidamente do estado sólido, em condições secas ou quase secas, para uma mistura de coloides hidratados em soluções aquosas. Dessa maneira, o procedimento de reidratação deve ser paulatino, controlando o volume de água, pois tanto grandes volumes de água podem causar diferenças importantes na viabilidade, imediatamente após a reidratação, como a reidratação prévia em um pequeno volume de água que diminui, mas não extingue a mortalidade ocasionada por soluções diluídas, além de poder resultar em uma recuperação mais pobre do micro-organismo.

As células devem suportar alto estresse osmótico durante a reidratação, até que estejam completamente hidratadas. Em princípio, a reconstituição com o volume exato do que é removido durante a secagem, seria suficiente para restaurar a condição original. No entanto, pode-se levar algum tempo até que os sólidos secos se dissolvam completamente. Um gradiente de concentração pode surgir, a depender da osmolalidade do meio de reidratação, e um ambiente hipotônico pode ser criado até que os excipientes secos estejam totalmente dissolvidos. No caso de um volume maior de reconstituição, pode permitir a dissolução mais rápida dos sólidos secos, mas pode ser prejudicial porque cria uma solução extracelular hipotônica após reconstituição completa (ROCKINGER *et al.*, 2021).

Segundo Rockinger *et al.* (2021), meios de reidratação com osmolalidade mais alta, como meios de reidratação, com 10% de leite desnatado, meio PTM (consistindo em 1,5% peptona, 1% triptona, 0,5% extrato de carne), 10% de sacarose, PBS ou água, encontrou-se viabilidade mais alta para a maioria dos meios complexos, indicando que além da prevenção do choque osmótico, o meio complexo pode ter a capacidade de reparar células afetadas.

A temperatura e o tempo de reidratação são importantes e devem ser padronizados. Temperaturas entre 30 e 37° C são melhores para manter a viabilidade pós - hidratação, devendo-se ter cuidado para não utilizar temperaturas acima de 46° C, que pode ser prejudicial à função celular. Um período mínimo de hidratação permite que as partículas se dissolvam e gerem uma suspensão de célula homogênea. No entanto, tempo prolongado de hidratação não é aconselhável, já que pode resultar em iniciação de crescimento, prejudicando a acidificação do meio (CHAMPAGNE *et al.*, 2011).

2.6 Sucos de frutas como meio de desidratação de probióticos

2.6.1 Frutas

As frutas são fonte de carboidratos, fibras, vitaminas hidrossolúveis, pró-vitamina A, polifenóis, compostos aromáticos, carotenoides, fitoesteróis e outras substâncias bioativas. São comumente pobres em lipídios na polpa e na casca, estando presente em maior quantidade nas sementes, as quais são pouco consumidas. O teor de água das frutas encontra-se entre 70 a 90% e o conteúdo de proteína é variável e escasso (RODRÍGUEZ *et al.*, 2020).

Os compostos fenólicos estão presentes em altas concentrações em frutas e vegetais e constituem uma ampla gama de moléculas bioativas produzidas como metabólitos secundários pelas plantas, com diferentes funções fisiológicas. Os compostos fenólicos ou polifenóis

possuem um ou mais anéis aromáticos com grupos hidroxila e são classificados como flavonoides ou não flavonoides. Os flavonoides podem ser flavonóis, flavonas, flavanonas, flavonoides, flavononas e antocianinas. Ácidos fenólicos, lignanas, taninos e estilbenos compõem um grupo distinto, conhecido como fenólicos não flavonoides. (BORGONOV *et al.*, 2022; RODRÍGUEZ *et al.*, 2020).

Estima-se que mais do que cem moléculas de compostos fenólicos podem ser encontradas em plantas comestíveis, compartilhando uma estrutura semelhante caracterizada pela substituição de um anel de benzeno na molécula por pelo menos um grupo hidroxila. Os fenólicos podem ser encontrados em formas únicas (ácidos fenólicos) ou ligados a carboidratos, formando moléculas complexas como glicosídeos. A grande família dos polifenóis é conhecida por suas atividades antioxidantes, anticarcinogênicas, antimutagênicas e hipoglicemiantes (RODRÍGUEZ *et al.*, 2020).

Nas últimas décadas, o reconhecimento do valor nutricional das frutas tem proporcionado um aumento no consumo, bem como o emprego de novos processos responsáveis por agregar valor e aumentar a vida útil de produtos gerados a partir de frutas. Frente a essa situação, tem-se observado a expansão do mercado brasileiro de sucos – bebida que alia sabor, conveniência, inovação e prazer – além de fornecer alto valor nutricional e funcional (ALBUQUERQUE *et al.*, 2021; PIMENTEL *et al.*, 2020).

Atualmente, as bebidas são uma das mais representativas categorias de alimentos funcionais, devido à conveniência e possibilidade de atender às demandas dos consumidores quanto ao conteúdo, tamanho, forma, aparência, bem como a facilidade de distribuição e armazenamento para produtos refrigerados, com vida de prateleira estável (CORBO *et al.*, 2014).

Os sucos de frutas são considerados matrizes favoráveis à incorporação de probióticos, por conterem grandes quantidades de açúcares, vitaminas e minerais que aumentam a sobrevivência dos micro-organismos durante o armazenamento. No entanto, nem sempre são adequados para aplicação em probióticos, devido ao baixo teor de proteínas e aminoácidos e a presença de compostos fenólicos, flavonoides e ácidos orgânicos, que pode inibir o crescimento das bactérias lácticas (NUALKAEKUL *et al.*, 2013).

Suco de fruta é considerada uma matriz de desafio para probióticos, por causa do baixo pH, presença de ácidos orgânicos e ausência de moléculas tipicamente presente no leite, reconhecidas por afetar a viabilidade celular, sendo, portanto, a seleção do tipo de suco, um fator-chave para estabilidade dos probióticos (MONTEIRO *et al.*, 2020; HORÁCKOVÁ *et al.*, 2018).

2.6.2 Araticum-do-cerrado

O araticum (*Annona crassiflora* Mart.) é conhecido popularmente como bruto, cabeça-de-negro, cascudo, panã, marolo, pinha-do-Cerrado, pertence à família *Annonaceae* (BRAGA FILHO *et al.*, 2009) e encontra-se amplamente distribuído no Cerradão, Cerrado *stricto sensu* e Campo Rupestre, abrangendo os estados da Bahia, Goiás, Maranhão, Mato Grosso, Mato Grosso do Sul, Minas Gerais, Pará, Piauí, São Paulo e Tocantins, além do Distrito Federal (SILVA; GOMES; MARTINS, 2009).

O araticum é um dos frutos nativos do bioma cerrado, o qual tem uma área de ocorrência extremamente ampla, apresenta características próprias com grande diversidade vegetal e um ambiente rico em outras espécies frutíferas e comestíveis como pequi, fava-danta, umbu, cajuí, cagaita, mangaba, coquinho azedo, umbu, buriti (ICMBio, 2019).

Annona crassiflora Mart. é uma árvore que apresenta altura entre 4 e 8 m, produz uma fruta oval redonda conhecida como araticum, tem características sensoriais únicas como cor atraente, sabor e aroma exótico, além de alto teor de nutrientes e compostos bioativos. Sua polpa é caracterizada como amarela, doce, com aroma forte e peculiar (BAILÃO *et al.*, 2015).

O araticum é uma fruta cuja polpa contém alto teor de carboidratos (18,65%), lipídios (3,78%) e valor energético (113,65 kcal / 100 g), e como outras frutas, apresenta baixo percentual de proteína (1,27%). A fruta é uma excelente fonte de vitamina A, fibra alimentar, cobre e manganês, uma vez que 100 g de polpa de fruta representam cerca de 115,53, 86,48, 46,00 e 22,00% da ingestão diária recomendada, respectivamente. O fruto também mostrou ser uma boa fonte de potássio, magnésio, zinco, vitamina C e folatos, contribuindo com aproximadamente 10,82, 7,95, 5,40, 8,72 e 6,84% da ingestão diária recomendada, respectivamente (ARRUDA *et al.*, 2019).

A polpa do araticum é uma fonte rica em fitoquímicos com atividade antioxidante, como os carotenoides, compostos fenólicos, tocoferóis, flavonoides e algumas vitaminas e minerais. Segundo Arruda (2019), 100 g da polpa de araticum fornece o equivalente a ingestão diária recomendada de vitamina A. No entanto, observou-se que o teor de carotenoides pode ser afetado pelo branqueamento e pasteurização, diminuindo significativamente o α -caroteno enquanto o valor β -caroteno foi aumentado.

Importantes moléculas bioativas foram identificadas no araticum, usando espectrofotômetro de massa (ESI-MS), incluindo ácido ascórbico, ácido cafeico, ácido quínico, ácido ferúlico, xantoxilina e rutina. Esses compostos podem estar envolvidos com a atividade antioxidante observada nessa fruta (BAILÃO *et al.*, 2015).

Arruda *et al.* (2019) notou a presença de ésteres como os compostos mais prevalentes na polpa de araticum, sendo os componentes voláteis mais abundantes, responsáveis pelo odor floral e aroma frutado do araticum. Estudos mais aprofundados permitiram ainda a identificação de 112 compostos fenólicos, oriundos da casca da fruta, sendo 73 flavonoides, 33 ácidos fenólicos e outros 6 fenólicos. Tais compostos fenólicos demonstraram possuir diversas bioatividades ou benefícios à saúde, com propriedades antitumoral, antioxidante, anti-inflamatória, antimicrobiano, anti-hipertensivo e hepatoprotetora.

O araticum, além de ser importante pelo seu conteúdo nutricional ou funcional, tem uma importante participação no controle do impacto ambiental, econômico e social da região em que é encontrado, qualificando-o como produto da sociobiodiversidade – que são bens e/ou serviços (produtos finais, matérias-primas ou benefícios) gerados a partir de recursos da biodiversidade, voltados à formação de cadeias produtivas de interesse dos povos e comunidades tradicionais e de agricultores familiares – os quais promovem a manutenção e valorização de suas práticas e saberes, assegurando os direitos deles decorrentes, como a geração de renda e promoção da melhoria de sua qualidade de vida e do ambiente em que vivem (BRASIL, 2021).

2.6.3 Frutas como matriz de desidratação de probióticos

O consumo de frutas tem aumentado mundialmente devido ao reconhecimento de seu valor nutricional e por ser fonte de compostos com propriedades bioativas relacionadas à saúde. No entanto, como as frutas frescas são altamente susceptíveis à decomposição, maior parte da produção de frutas é normalmente destinada ao processamento de sucos e polpas congeladas (ARAÚJO *et al.*, 2020).

A atividade de água elevada das frutas *in natura* requer um processo de estabilização, para que possam ser armazenadas por longos períodos. A secagem permite aumentar a vida de prateleira do produto, ao reduzir a atividade de água, limitando o desenvolvimento de micro-organismos patogênicos, conferindo características específicas ao produto (BETORET *et al.*, 2020) e a liofilização assegura uma melhor preservação no processamento, incluindo maior retenção de compostos bioativos, cor e firmeza das frutas. Dessa maneira, vários produtos de frutas, como sucos de frutas e frutas em pó, têm sido apresentados como carreadores de probióticos (OLIVEIRA *et al.*, 2021).

Segundo os estudos de Nualkaekul (2012), os sucos de fruta instantâneos em pó são bons carreadores de probióticos e constituem alternativas a sucos de frutas altamente ácidos. Após a reconstituição do suco instantâneo em pó, a atividade de água e o pH foram os principais

fatores a influenciar a sobrevivência das células. Já o ácido cítrico, a fibra e a concentração de fenólicos totais não exerceram efeito significativo. Tais achados devem-se ao pH, aos níveis de ácidos orgânicos, à fibra alimentar, à proteína, aos fenólicos totais e ao oxigênio serem os principais fatores que influenciam a sobrevivência de probióticos em sucos de frutas. O alto teor de fibra e de proteínas demonstrou ser mais favorável a sobrevivência de probióticos durante armazenamento refrigerado, enquanto o baixo pH e alta concentração de fenólicos totais foram responsáveis por alta taxa de mortalidade da estirpe *L. plantarum* em armazenamento refrigerado.

De acordo com Araújo *et al.* (2020) os coprodutos do processamento das frutas (acerola, caju e goiaba) exerceram efeitos protetores sobre estirpes probióticas do gênero *Lactobacillus* quando submetidos à liofilização e armazenamento prolongado de 90 dias, sob condições de refrigeração (4° C) e a temperatura ambiente (25° C), sendo maiores os efeitos protetores quando as estirpes foram armazenadas sob refrigeração. A presença de açúcares, fibras e compostos fenólicos nas frutas pode estar diretamente associada aos efeitos estabilizadores sobre os probióticos durante a liofilização e armazenamento, indicando que os coprodutos de frutas podem proteger e aumentar a estabilidade dos *Lactobacillus*.

O estudo de Betoret *et al.* (2020) demonstrou que no desenvolvimento de alimentos funcionais probióticos, uma matriz alimentar específica pode permitir, simultaneamente, a multiplicação de probióticos e o fornecimento de proteção durante a vida útil do produto. E, que a incorporação de probióticos em uma matriz de frutas, além de desenvolver uma nova categoria de produtos alimentícios probióticos, pode proteger os micro-organismos dos estresses sofridos durante o processamento, armazenamento e digestão gastrointestinal.

Segundo Garcia *et al.* (2018), frutas e seus subprodutos do processamento industrial podem ser fontes potenciais de bactérias lácticas com as características necessárias às estirpes probióticas. BAL, oriundas de frutas *in natura*, podem apresentar melhor capacidade de sobreviver em condições de baixo pH, o que pode ajudá-las a sobreviver em formulações à base de frutas, bem como no trato gastrointestinal humano. Nesse estudo foi demonstrado que as culturas liofilizadas de *L. plantarum* 49 e *L. brevis* 59, isoladas de subprodutos de *Malpighia glabra* L. (acerola); *L. paracasei* 108 e *L. fermentum* 111, isoladas de subprodutos de *Annona muricata* L. (graviola); e *L. pentosus* 129, isolada de subprodutos de *Mangifera indica* L. (manga) foram capazes de sobreviver durante o período armazenamento a -20° C, por até 120 dias e mantiveram altas taxas de sobrevivência em até 14 dias de armazenamento sob refrigeração (4 ± 0,5° C) quando inoculadas em sucos de maçã, uva e laranja.

Conforme o estudo de Bellis *et al.* (2021), as matrizes à base de vegetais, são substratos elegíveis para hospedar e fornecer populações microbianas, devido à sua riqueza em nutrientes, fibras, vitaminas, minerais e fitoquímicos bioativos dietéticos. As propriedades promotoras de saúde de matrizes vegetais, como alcachofra, azeitona, maçã e repolho e sua associação com bactérias probióticas, indicaram a importância do papel da matriz alimentar na sustentação das células probióticas durante: o processamento do produto, processo digestivo, implantação intestinal, bem como a sobrevivência e a estabilidade do probiótico na matriz alimentar; todas, condições altamente dependentes da estirpe utilizada.

Além da composição de nutrientes, a microarquitetura que caracteriza as superfícies de frutas e vegetais representa um nicho adequado para hospedar células microbianas, onde elas são protegidas contra estresses ambientais e de processamento, bem como daqueles causados por enzimas e substâncias químicas, que tentam a integridade celular, durante o processo digestivo. Os tecidos vegetais - compostos por uma microestrutura interna de células, poros e espaços intercelulares - podem desempenhar um papel na adesão de microrganismos e podem atuar como carreadores de células probióticas (BELLIS, *et al.*, 2021)

Nualkaekul *et al.* (2012) demonstrou que os principais fatores a influenciar a sobrevivência de probióticos em sucos de frutas em pó liofilizados foram o pH, níveis de ácidos orgânicos, fibra alimentar, proteína, fenólicos totais e oxigênio. Um alto teor de fibra alimentar e proteína mostrou-se favorável à sobrevivência de probióticos durante o armazenamento refrigerado em sucos de frutas, enquanto o baixo pH (3.2) e a alta concentração de fenólicos totais foram responsáveis pela alta redução de células viáveis de *L. plantarum* e *B. longum* num período de 1 a 4 semanas em armazenamento refrigerado.

Por outro lado, Rodríguez *et al.* (2020) relatou que os compostos fenólicos presentes em algumas frutas podem impulsionar o crescimento probiótico, enquanto inibe a propagação de bactérias patogênicas, como *E. coli* e *S. typhimorium*, além de terem efeito positivo na adesão, crescimento e sobrevivência de probióticos, ao usar diferentes extratos de frutas.

De acordo com Bellis *et al.* (2021), as matrizes de frutas e hortaliças podem ser transformadas em alimentos probióticos, uma vez que a atividade benéfica e a eficácia do probiótico podem ser melhoradas e moduladas por componentes da matriz vegetal, gerando um produto funcional final, em que as propriedades promotoras de saúde da matriz vegetal são adicionadas, sinergicamente, ao efeito benéfico da estirpe probiótica.

3. METODOLOGIA

3.1 Tipo de estudo

Trata-se de um estudo experimental quantitativo e qualitativo. O estudo foi dividido nas seguintes etapas: (i) produção de formulações liofilizadas com a estirpe *Lactobacillus plantarum* SBR64.7 em leite e suplementadas com diferentes percentuais de polpa de araticum; (ii) análise da composição centesimal das formulações; e (iii) análise da viabilidade e sobrevivência do *L.plantarum* antes da liofilização e durante o armazenamento; (iv) sobrevivência de *L. plantarum* após exposição às condições simuladas *in vitro* do trato gastrointestinal; (v) determinação da atividade antimicrobiana das formulações liofilizadas e (vi) determinação da capacidade antioxidante das formulações liofilizadas.

3.2 Coleta e preparo da polpa de fruta

A fruta araticum foi adquirida em feira livre de Brasília, Distrito Federal, Brasil. As frutas foram lavadas e em seguida higienizadas por 15 minutos em solução contendo o agente sanitizante Hidrosan Plus[®]. Em seguida, as frutas foram despolpadas manualmente, distribuídas cerca de 200g em sacos plásticos. As embalagens contendo a polpa de fruta foram seladas a vácuo e imediatamente armazenadas em ultrafreezer a -80° C (modelo MDF U54VC, Sanyo, Illinois, Estados Unidos).

3.3 Elaboração do leite desnatado reconstituído enriquecido com polpa de araticum

As formulações elaboradas com leite desnatado reconstituído (LDR) a 10% e polpa de araticum foram as seguintes:

- (i) Formulação 1 (C): LDR 100% (controle);
- (ii) Formulação 2 (F1): LDR 95% + 5% de polpa de araticum;
- (iii) Formulação 3 (F2): LDR 90% + 10% de polpa de araticum;
- (iv) Formulação 4 (F3): LDR 85% + 15% de polpa de araticum.

No preparo das formulações, foi utilizado 120g LDR 10% reconstituído em 1200 mL de água mineral e processado em liquidificador (Walita[®] modelo RI7630/22) em potência 1 por 30 segundos e em potência 2 por mais 30 segundos. Em seguida, o LDR 10% foi distribuído em diferentes frascos de vidro para adição dos diferentes percentuais da polpa de araticum. Novamente, as formulações foram processadas em liquidificador conforme foi descrito

anteriormente. Em seguida, as diferentes formulações foram submetidas ao tratamento térmico de pasteurização lenta (65° por 15 minutos) em banho de água (Warmnest®, modelo HH-S₁₀). Após a pasteurização, as formulações foram refrigeradas a 4°C por 16 horas para posterior inoculação da cultura.

3.4 Preparo do concentrado de células de *L. plantarum*

3.4.1 Micro-organismo e preparo da cultura estoque

Foi utilizada a cultura de *L. plantarum* SBR64.7 pertencente à coleção de culturas do Laboratório de Higiene dos Alimentos, Departamento de Nutrição, Faculdade de Ciências da Saúde da Universidade de Brasília. Para o preparo da cultura estoque, retirou-se 100 µL da cultura estocada em ultrafreezer a - 80° C (modelo MDF U54VC, Sanyo, Illinois, Estados Unidos) e em seguida inoculou-se em 5 mL de caldo De Man Rogosa Sharpe (MRS) (Acumedia-Neogen, Michigan, EUA). Posteriormente, a cultura foi incubada em estufa bacteriológica a 37° C por 24 horas. Em seguida, uma alíquota de 100 µL da cultura ativa foi adicionada em 5 mL de caldo MRS, permanecendo em estufa nas mesmas condições mencionadas anteriormente. Seguiu-se uma nova ativação, com uma alíquota de 200 µL da cultura ativa inoculada em 5 mL de caldo MRS, sendo utilizadas as mesmas condições de incubação mencionadas anteriormente.

Para confirmação da pureza da cultura, fez-se estria em placa de Petri contendo ágar MRS, e em seguida incubou-se a placa em estufa a 37° C por 24 hora. Em seguida, foram selecionadas colônias isoladas com auxílio da alça de repicagem e adicionadas em 5 mL de caldo MRS. Em seguida, os tubos foram incubados em estufa a 37° C por 24 hora. Posteriormente foi adicionado 600 µL da cultura ativa (inóculo de 2%) em tubos contendo 30 mL de caldo MRS. Os tubos foram incubados nas mesmas condições mencionadas anteriormente. Em seguida, centrifugou-se a cultura ($2.655 \times g$, 4° C, 10 minutos), descartou-se o sobrenadante e o pellet obtido foi lavado com caldo MRS. O pellet foi centrifugado nas mesmas condições e adicionado de caldo MRS com 20% de glicerol (MESQUITA *et al.*,2020). Homogeneizou-se em um agitador de tubos e, em seguida, a suspensão de células obtida foi distribuída em três tubos criogênicos de capacidade de 2 mL e imediatamente estocados em ultrafreezer a -80° C (modelo MDF U54VC, Sanyo, Illinois, Estados Unidos). Todos experimentos foram realizados a partir da cultura estoque.

3.4.2 Produção do concentrado de células de *L. plantarum*

A cultura estoque de *L. plantarum* a -80°C foi cultivada em 5 mL de caldo MRS em estufa a 37°C por aproximadamente 16 horas. Em seguida, a cultura ativa foi estriada em Placa de Petri contendo ágar MRS e imediatamente a placa foi incubada a 37°C por 48 horas. Após a confirmação da pureza da cultura, inoculou-se em 5 mL de caldo MRS e, imediatamente, foi incubada a 37°C por aproximadamente 16 horas. Inóculo de 2% da cultura foram distribuídos em tubos contendo 30 mL de caldo MRS, sendo utilizadas as mesmas condições de incubação mencionadas anteriormente. O tubo contendo 30 mL da cultura crescida foi submetido à centrifugação ($2.655 \times g$, 4°C , 10 minutos). Em seguida, o sobrenadante foi descartado e o pellet de células formado foi lavado com solução salina 0,85% e, imediatamente, homogeneizado em um agitador de tubos. Novamente, a suspensão de células foi centrifugada e posteriormente lavada, nas mesmas condições mencionadas anteriormente.

3.4.3 Preparo das suspensões de células nas diferentes formulações de leite suplementado com polpa de araticum

O pellet de células obtido no item 3.4.2 foi suspenso nas diferentes formulações descritas no item 3.3. Após a obtenção da suspensão de células nas diferentes formulações, essas foram distribuídas (1 mL) em 120 frascos de vidro de capacidade de 10 mL. Os frascos foram vedados com plástico parafilme e, em seguida, foram realizados micro furos com agulha estéril.

3.5 Liofilização das amostras

3.5.1 Congelamento das amostras

Os frascos de vidro contendo um 1 mL de cada formulação, conforme obtido no item 3.4.3, foram congelados em ultrafreezer (modelo MDF U54VC, Sanyo, Illinois, Estados Unidos) a -80°C por 16 horas.

3.5.2 Liofilização

As amostras congeladas foram transferidas imediatamente para o liofilizador (modelo Gama 1-16 LSC plus, Christ, Osterode, Alemanha). As condições para liofilização das amostras foram as seguintes: temperatura de -85°C no condensador e 0°C nas prateleiras e pressão 0.0721 mbar (milibar). O processo de liofilização foi realizado por aproximadamente 10 horas.

Após a liofilização, utilizou-se o alicate recravador de frascos de vidro para fechamento dos frascos, sendo executado todo procedimento na capela de fluxo laminar. Primeiramente, fechou-se os frascos com tampa de borracha, com auxílio de uma pinça, previamente flambada e, posteriormente, foi feito a recravação com os lacres de alumínio. Após recravamento, as amostras foram armazenadas em estufa (modelo MCO-18 AC, Sanyo, Osaka, Japão) a 25° C para análises subsequentes.

3.6 Análise da composição centesimal das formulações

Após produção e congelamento das formulações, a -20° C, sem adição do concentrado de células, as bebidas foram transportadas em caixa térmica higienizada para o Laboratório de Análise de Alimentos, da Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária da Universidade de Brasília. As quatro formulações foram submetidas à análise de composição para análise da caracterização química. As seguintes análises foram realizadas:

3.6.1 Umidade

A umidade foi determinada de acordo com as Normas Analíticas do Instituto Adolfo Lutz (2008), no qual seguiu-se duas etapas. Primeiro as amostras foram pesadas (cerca de 400 g) e colocadas em recipientes de porcelana, na sequência foram submetidas à estufa a 60° C por 24 horas, para parcial evaporação da água e concentração da matriz, até obterem peso constante. Logo após, foram pesados cerca de 2 g das amostras em cadinhos, que permaneceram em estufa a 105° C por 4 horas, até obterem peso constante. A umidade foi expressa em porcentagem de base úmida, utilizando a seguinte equação:

$$\text{Umidade (\%)} = \frac{m_1 + m_2}{2} \quad \text{Equação (1)}$$

Em que:

m_1 = massa de água evaporada na primeira etapa (g);

m_2 = massa de água evaporada na segunda etapa (g);

m_t = massa total da amostra (g) (DOS SANTOS, 2020).

3.6.2. Proteína

O teor de proteína foi realizado pelo método de Kjeldahl 991.22 (AOAC, 2005). Pesou-se cerca de 2 g de cada amostra e colocou-se em tubos contendo 1 g de mistura catalítica. Posteriormente, foi adicionado 3,5 mL de H₂SO₄ 4%, seguindo para bloco digestor a 450° C.

Em seguida, as amostras foram acrescidas de 10 mL de água destilada para destilação do nitrogênio realizada com o destilador Tecnal (modelo TE – 0363). Para cada amostra, cerca de 7,5 mL de H₃BO₃ foram adicionados em béqueres de vidro e 4 gotas de azul de metileno, que fora utilizado como indicador. Os tubos contendo as amostras e os béqueres com solução de ácido bórico foram alocados no destilador e NaOH 50% foi adicionado no copo medidor do aparelho, iniciando-se, então, o processo de destilação. Realizou-se a titulação com HCl 0,1 M até as amostras atingirem o ponto de viragem. A obtenção do nitrogênio foi expressa em porcentagem pela seguinte equação:

$$\% N = \frac{V \times M \times f \times 14}{m} \times 100 \quad \text{Equação (2)}$$

Em que:

V = volume gasto da solução de HCl na titulação;

M = molaridade da solução de HCl;

f = fator de correção da solução de HCl;

m = massa da amostra (mg)

A obtenção do teor de proteína foi determinada pelo fator de conversão de nitrogênio (% N) de 6,38, em razão das amostras possuírem, em sua maior parte, leite desnatado. O cálculo foi feito, com base na seguinte equação:

$$\% \text{ Proteína} = \% N \times 6,38 \quad \text{Equação (3)}$$

3.6.3. Lipídio

O teor lipídico total foi determinado pelo método de extração Am 5-04, utilizando o extrator de lipídios (modelo ANKOM XT15 da Ankom Technology, New York, EUA) (AOCS, 2005). Após exposição à estufa a 60° C por 24 horas, para parcial evaporação da água e concentração da matriz, como descrito no item 3.6.1, pesou-se cerca de 1 g de cada amostra, no qual foram colocadas em sacos de extração de lipídios e alocadas em cartuchos apropriados do extrator. Foi utilizado éter de Petróleo como solvente para extração. Em seguida, as amostras foram inseridas em estufa a 105° C, para evaporação do solvente e pesadas. Os valores de lipídio foram obtidos pela diferença de massa após extração. Utilizou-se também a massa das amostras em base úmida, assim o teor de lipídio foi determinado pela seguinte equação:

$$\% \text{ Lipídeos} = \frac{(100 \times m_L)}{m} \quad \text{Equação (4)}$$

Em que:

m_L = gramas de lipídeos extraídos

m = gramas de amostra em base úmida

3.6.4. Fibras

O teor de fibra bruta foi determinado pelo método gravimétrico, com adaptações (AOAC, 2005).

As amostras foram secas, inicialmente, em estufa a 60° C para remoção parcial da umidade. Posteriormente, foram pesadas em saquinhos específicos para análise de fibras, com cerca de 1,5g e colocadas em estufa com circulação de ar a 105° C por 3 horas.

Deu-se início à análise com a digestão ácida, tendo sido preparada uma solução ácida de 16 mL de H₂SO₄ a 1,25% e 1000 mL de água destilada. Em seguida, os saquinhos com as amostras foram colocados em um erlenmeyer, completamente, imersos na solução ácida e levado à autoclave a 100° C por 30 min. Depois, foi removida a solução ácida e os sacos foram enxaguados com água destilada e colocados em um erlenmeyer imersos em 1000 mL de água destilada e, novamente, levado à autoclave a 100° C por 30 min.

Finalizada a etapa da digestão ácida, iniciou-se a digestão básica, tendo sido preparado uma solução básica de 25 mL de NaOH a 1,25% e 1000 mL de água destilada. Foram adotados os mesmos procedimentos utilizados na digestão ácida. Os saquinhos com as amostras foram colocados em um erlenmeyer, completamente, imersos na solução básica e levado à autoclave a 100° C por 30 min. Posteriormente, os saquinhos foram enxaguados com água destilada e colocados em um erlenmeyer imersos em 1000mL de água destilada e, mais uma vez, levado à autoclave a 100° C por 30 min (AOAC, 2005).

Após ter sido retirado o erlenmeyer da autoclave, removeu-se a água destilada e os saquinhos foram totalmente submersos em acetona e expostos à temperatura ambiente para secagem. Posteriormente, os saquinhos foram levados à estufa com circulação de ar a 105° C por 2 horas e, em seguida, pesados.

Para obtenção dos valores de fibra bruta, fez-se necessário calcular a massa das amostras em base úmida e em base seca e determinado o total de fibra bruta, segundo a equação:

$$\% \text{ Fibra Bruta} = \frac{(P_{dg} - P_s)}{m_{úmida}} \times 100 \quad \text{Equação (5)}$$

Em que:

P_{dg} = Peso da amostra após digestão e com saquinho

P_s = Peso do saquinho

$M_{úmida}$ = Massa da amostra em base úmida

3.6.5. Carboidrato

O teor de carboidratos totais presente nas diferentes formulações foi determinado pela diferença, subtraindo-se de 100 os valores encontrados para umidade, teor de proteína, teor de lipídios e teor de fibras, conforme método 986.25 (AOAC, 2005). Os valores de carboidratos foram obtidos pela seguinte equação:

$$\% \text{ CHO} = 100 - \% \text{ Umidade} - \% \text{ Proteína} - \% \text{ lipídeo} - \% \text{ Fibra} \quad \text{Equação (6)}$$

3.7 Caracterização da viabilidade e sobrevivência de *L. plantarum* durante o armazenamento

3.7.1 Análise da viabilidade e sobrevivência

A viabilidade de *L. plantarum* foi determinada antes e após a liofilização, e também durante o período de armazenamento (7, 14, 21, 28 e 120 dias).

Para as amostras não liofilizadas foram utilizados 100 μL da suspensão de células, que foram diluídas seriadamente até a diluição 10^{-10} em 900 μL de solução salina 0,85%. As diluições 10^{-5} a 10^{-10} foram selecionadas para serem plaqueadas em placas de Petri contendo meio de cultura ágar MRS, pela técnica *Drop Plate*. Após plaqueamento, as placas foram incubadas em estufa a 37°C por 18 horas e feito a contagem após 48 horas. O número de Unidades Formadoras de Colônias (UFC) foi determinado após o período de incubação e expressos em $\log \text{ UFC/mL}$.

As amostras após a liofilização e as armazenadas a 25°C foram reconstituídas em 1 mL de solução salina 0,85% e, em seguida, homogeneizada gentilmente. As amostras ficaram por 15 minutos a 25°C para que houvesse a recuperação das células. Posteriormente, seguiu-se o procedimento de diluição, plaqueamento, incubação e contagem das placas, conforme descrito anteriormente.

Para avaliar o efeito do tempo de armazenamento (7, 14, 21, 28 e 120 dias) na sobrevivência de *L. plantarum* o percentual de sobrevivência foi calculado usando a Equação (7):

$$S (\%) = \log \text{UFC} \times N_F / \log \text{UFC} N_0 \times 100$$

Em que:

S = percentual de sobrevivência;

N_F = número final (para cada tempo de armazenamento) da contagem de UFC;

N_0 = número inicial (após a liofilização) da contagem de UFC.

3.8 Sobrevivência de *L. plantarum* nas diferentes formulações liofilizadas após exposição às condições simuladas *in vitro* do trato gastrointestinal

A análise da viabilidade do *L. plantarum* em cada formulação foi determinada: (i) antes da exposição ao suco gástrico e intestinal, (ii) após exposição ao suco gástrico, (iii) após exposição ao suco intestinal e (iv) após exposição ao suco gástrico e intestinal em condições sucessivas.

(i) Amostras antes da exposição ao suco gástrico e intestinal

Para as amostras analisadas antes da exposição ao suco gástrico e intestinal, primeiramente, reconstitui-se as a mostras em 1 mL de solução salina 0,85% e, em seguida homogeneizou-se gentilmente. Alíquotas de 200 μ L da suspensão de células foram transferidas para microtubos de capacidade de 1,5 mL e submetidas à centrifugação (2.655 \times g, 4° C, 10 minutos). Em seguida, o sobrenadante foi descartado e o pellet de células formado foi lavado com solução salina 0,85% e, imediatamente, homogeneizado em um agitador de tubos. Novamente, a suspensão de células foi centrifugada e posteriormente lavada, nas mesmas condições mencionadas anteriormente. Em seguida, foram diluídas seriadamente até a diluição -8 em 200 μ L de solução salina 0,85%. O plaqueamento foi feito nas diluições (-1 até -8) em placas de Petri contendo meio de cultura ágar MRS, pela técnica *Drop Plate*. Após plaqueamento, as placas foram incubadas em estufa bacteriológica a 37° C por 48 horas e realizado a contagem após 48 horas. O número de UFC foi determinado após o período de incubação, expressos em log UFC/mL.

(ii) Suco gástrico

O suco gástrico sintético foi preparado de acordo com o protocolo de Bautista-Gallego *et al.* (2013), com modificações. O suco gástrico foi preparado com NaCl (0,205 g/l), K_2HPO_4 (0,06 g/l), KCl (0,037 g/l) e água destilada. O pH foi ajustado para 2,0 com HCl 1 M e posteriormente, a solução foi autoclavada a 121° C por 15 minutos. Para a condução das análises a solução tampão foi dividida em três partes iguais (33 mL) e no dia da realização dos

experimentos foi adicionada a solução de pepsina (5 µL/50 mL) (Dinâmica®, Indaiatuba, SP, Brasil) e lisozima (50 µL/50 mL) (Sigma-Aldrich®, St Louis, MO).

Primeiramente, reconstitui-se as amostras em 1 mL de solução salina 0,85% e, em seguida, homogeneizou-se gentilmente. Transferiu-se alíquotas de 200 µL da suspensão de células para microtubos de capacidade de 1,5 mL e adicionou-se 200 µL de suco gástrico. Incubou-se em estufa bacteriológica a 37° C por 90 min. Posteriormente, submeteu-se à centrifugação (2.655 x g, 4° C, 10 minutos), em seguida, o sobrenadante foi descartado e o pellet de células formado foi lavado com solução salina 0,85% e, imediatamente, homogeneizado em um agitador de tubos. Novamente, a suspensão de células foi centrifugada e posteriormente lavada, nas mesmas condições mencionadas anteriormente. Em seguida, foram diluídas seriadamente até a diluição -8 em 200 µL de solução salina 0,85%. Foi feito o plaqueamento das diluições (-1 até -8) em placas de Petri contendo meio de cultura ágar MRS, pela técnica *Drop Plate*. Após plaqueamento, as placas foram incubadas em estufa a 37° C por 48 horas e realizado a contagem após 48 horas. O número de UFC foi determinado após o período de incubação, expressos em log UFC/mL.

(iii) *Suco intestinal*

O suco intestinal foi preparado com fosfato de sódio dibásico heptahidratado (5,081 g/L), NaCl (0,85 g/L) e água destilada. Adicionou-se a solução sais biliares (0,3 g/L) (Sigma-Aldrich®) e o pH da solução foi ajustado para 8,0 com auxílio de solução de NaOH 1M. Posteriormente, a solução foi autoclavada a 121°C por 15 minutos. Para a condução das análises, o suco intestinal foi dividido em três partes iguais (33 mL) e no dia da realização dos experimentos foi adicionada a solução de pancreatina (500 µL/50mL) (marca Sigma-Aldrich®). Primeiramente, reconstitui-se as amostras em 1mL de solução salina 0,85%, homogeneizando-se gentilmente. Transferiu-se alíquotas de 200 µL da suspensão de células para microtubos de capacidade de 1,5 mL, adicionou-se 200 µL de suco intestinal e foram incubadas em estufa bacteriológica a 37° C por 90 minutos. Posteriormente, submeteu-se à centrifugação (2.655 x g, 4° C, 10 minutos), em seguida, o sobrenadante foi descartado e o pellet de células formado foi lavado com solução salina 0,85% e, imediatamente, homogeneizado em um agitador de tubos. Novamente, a suspensão de células foi centrifugada e posteriormente lavada, nas mesmas condições mencionadas anteriormente. Em seguida, foram diluídas seriadamente até a diluição -8 em 100 µL de solução salina 0,85%. O plaqueamento foi feito nas diluições (-1 até -8) em placas de Petri contendo meio de cultura ágar MRS, pela técnica *Drop Plate*. Após plaqueamento, as placas foram incubadas em estufa

a 37° C por 48 horas e realizado a contagem após 48 horas. O número de UFC foi determinado após o período de incubação, expressos em log UFC/mL.

(iv) *Exposição sucessiva (suco gástrico e intestinal)*

O procedimento foi realizado de acordo com a metodologia descrita nos itens (ii) e (iii), exceto que após a exposição ao suco gástrico por 90 min, não foi feita a lavagem da suspensão de células, sendo feita a lavagem, após as amostras terem sido também expostas ao suco intestinal por 90 min. Os resultados foram expressos em log UFC/mL.

3.9 Determinação da atividade antimicrobiana das formulações liofilizadas

A atividade antimicrobiana das formulações foi realizada pelo método de atividade diferida (TAGG *et al.*, 1976).

A atividade antimicrobiana das formulações foi avaliada nas seguintes bactérias patogênicas: *Salmonella* ATCC 700623, *Escherichia coli* ATCC 25922 e *Staphylococcus aureus* ATCC 27626.

Primeiramente, ativou-se as culturas estoque a –80° C dos patógenos *Salmonella*, *E. coli* e *S. aureus*. Inoculou-se alíquotas de 100 µL de cada suspensão de células em 5 mL de meio de cultura caldo LB e incubou-se em estufa bacteriológica a 37°_C por 24 horas. Em seguida, as culturas ativas foram estriadas em Placa de Petri contendo ágar LB e imediatamente as placas foram incubadas a 37-° C por 48 horas. Após a confirmação da pureza das culturas, inoculou-se em 5 mL caldo LB e, imediatamente, foi incubada a 37° C por aproximadamente 24 horas. Posteriormente, as amostras liofilizadas, armazenadas há 12 dias, foram reconstituídas em 1 mL de solução salina 0,85% e homogeneizadas gentilmente. Em seguida, inoculou-se 5 µL de cada amostra no centro da placa contendo ágar MRS e incubou-se em estufa a 37°_C por 24 horas. No dia seguinte, adicionou-se 200 µL das culturas ativas dos patógenos em 15 mL do meio ágar LB semissólido. Posteriormente, verteu-se o meio LB semissólido nas placas contendo ágar MRS, com os tratamentos das formulações após incubação. Incubou-se as placas ágar MRS, em estufa a 37°_C por 48 horas e, em seguida, mediu-se o halo de inibição (mm) formado com auxílio de uma régua, medindo a distância do diâmetro do halo de inibição formado, tendo sido descontado o diâmetro da microgota (MA *et al.*, 2020).

3.10 Determinação da capacidade antioxidante

3.10.1 Preparo dos extratos

As amostras de bebida de araticum liofilizadas foram reconstituídas em 2 mL de metanol (50:50 v/v); homogeneizadas, a temperatura ambiente por 1 hora em agitador basculante. Em seguida, as amostras foram centrifugadas a $21.000 \times g$, 4°C por 15 min, e o sobrenadante recolhido (sobrenadante 1). O pellet foi solubilizado em 2 mL de acetona (70:30 v/v), homogeneizado por 1 hora a temperatura ambiente, centrifugado a $21.000 \times g$, 4°C por 15 min e o sobrenadante 2 foi recolhido. Os extratos de metanol e acetona (sobrenadantes 1 e 2) foram combinados e o volume final ajustado para 5 mL com água milliQ (LARRAURI, RUPÉREZ E SAURA CALIXTO, 1997), armazenadas a -80°C (modelo MDF U54VC, Sanyo, Illinois, Estados Unidos) para posterior determinação do potencial antioxidante.

3.10.2 Determinação da capacidade de eliminação de radicais livres (DPPH•)

A atividade de eliminação do radical DPPH• foi determinada de acordo com protocolo descrito por Cheng; Moore e Yu (2006), com modificações. O sistema reacional era composto por: 10 a 50 μL dos extratos das bebidas sendo o volume final de amostra completado para 100 μL com etanol e 100 μL de DPPH• 0,208 mmol/L (Sigma Aldrich, St. Louis, MO). Posteriormente, a placa era agitada por 3 segundos e a absorbância determinada a 515 nm a cada 1 min, durante 40 min (SpectraMax M3 Multi-Mode Microplate Reader, Molecular Devices, Sunnyvale, California, USA). Para cada amostra analisada foi feita uma reação denominada branco específico, onde o volume da solução de DPPH• foi substituído por etanol e para cada experimento foi feita uma reação denominada branco total na qual o volume de amostra foi substituído por etanol e uma reação controle contendo 100 μL de etanol e 100 μL de DPPH• 0,208 mmol/L. Uma curva padrão de 0 – 40 $\mu\text{mol/L}$ de ácido 6 hidroxil-2,5,7,8-tetrametilcromano-2-carboxílico (TROLOX, Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA) foi construída e o potencial antioxidante das amostras determinado de acordo com a fórmula descrita abaixo e expressos como micromoles de equivalentes de Trolox /grama de bebida liofilizada ($\mu\text{M TE/ g}$ bebida).

$$\text{DRSC} = \text{AUC amostra} / \text{AUC TROLOX} \times [\text{amostra}] / [\text{TROLOX}]$$

Onde: DRSC = capacidade de eliminação do radical DPPH• e AUC: área abaixo da curva.

3.10.3 Determinação da capacidade redutora de ferro (FRAP)

A capacidade antioxidante das amostras de bebidas de araticum liofilizadas foi determinada utilizando o ensaio FRAP, segundo método descrito por Benzie & Strain, 1996.

O reagente FRAP foi preparado a partir de tampão acetato 0,3 mol/L (pH 3,6), 2,4,6-Tris (2-piridil) -s-triazina (TPTZ) 10 mmol/L em HCl 40 mmol/L e 1 FeCl₃ 20 mmol/L (Sigma Aldrich, São Paulo, Brasil), na proporção 10:1:1 (v/v/v), e foi mantido em banho-maria a 37° C / 30 min, antes de ser adicionado à reação. A cada reação foram adicionados 180 µL do reagente FRAP, 10 µL de amostra e 14 µL água MilliQ, a microplaca foi agitada e a absorbância monitorada a 593 nm por 10 min em espectrofluorímetro (SpectraMax M Serie Multi-Mode Microplate Readers, San Jose, California). A capacidade antioxidante das amostras foi expressa em equivalente de TROLOX, utilizando uma curva padrão de ácido 6 hidroxil-2,5,7,8-tetrametilcromano-2-carboxílico (TROLOX) nas concentrações de **0 – 1500** µmol/L.

3.11 Análise estatística dos resultados

Todos os experimentos foram realizados em triplicata, e os resultados foram apresentados como média \pm erro padrão. A análise de variância (ANOVA), e o teste de Tukey foram usados para calcular diferenças significativas em $p < 0,05$. Os dados analisados em intervalos de tempo de armazenamento também foram submetidos à análise de regressão (exceto o da determinação da atividade antioxidante). As análises foram realizadas usando o software SAS (SAS Institute Inc., Cary NC, versão 9.4).

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Composição centesimal das formulações

A composição centesimal das formulações à base de leite e com adição de diferentes percentuais de polpa de araticum é mostrado na Tabela 1.

Tabela 1. Composição centesimal das formulações a base leite e com adição de polpa de araticum

Variáveis	Formulações ¹				P-valor
	C	F1	F2	F3	
Umidade	91,10 ± 0,07 b	91,44 ± 0,07 a	90,39 ± 0,07 c	89,57 ± 0,07 d	<.0001
Carboidratos	2,59 ± 0,32 b	2,94 ± 0,32 bc	3,96 ± 0,32 c	5,00 ± 0,32 a	<.0001
Proteínas	4,60 ± 0,30 a	4,12 ± 0,30 a	4,30 ± 0,30 a	3,78 ± 0,30 a	<.0001
Lipídios	0,44 ± 0,05 ab	0,54 ± 0,05 a	0,30 ± 0,05 b	0,36 ± 0,05 b	<.0001
Fibra bruta					<.0001
Cinzas	0,18 ± 0,16 a	0,77 ± 0,16 a	0,94 ± 0,16 a	0,94 ± 0,16 a	<.0001

Formulações¹: C: 100% LDR; F1: 95% LDR +5% araticum; F2: 90% LDR+10% araticum; F3: 85% LDR+15% araticum. Médias seguidas de mesma letra minúscula na linha não diferem estatisticamente pelo teste Tukey a 5% de probabilidade; n = três repetições.

Em relação ao teor de umidade, observou-se que à medida em que se aumentava o percentual de polpa de araticum reduzia-se significativamente ($p < 0,05$) o teor de umidade. Esta redução de umidade está associada com a menor disponibilidade de água livre que as formulações passam a apresentar à medida que aumenta o percentual de polpa de araticum.

O teor de carboidratos das formulações também foi afetado pela adição de polpa de araticum. Assim, quanto maior o percentual de polpa adicionado maior o teor de carboidratos obtido, sendo a formulação elaborada com 15% de polpa de araticum a que apresentou significativamente ($p < 0,05$) maior percentual de carboidratos. O araticum, como as demais frutas, apresenta alto teor de carboidratos. Arruda *et al.* (2019) obtiveram um percentual de 18,65% de carboidratos em polpa de araticum congelada. Damiani *et al.* (2011) obteve 24,55% de carboidratos em polpa fresca de araticum.

Com relação ao teor de proteínas das formulações já era esperado que seria a variável que apresentaria maiores valores, pelo fato de o leite ser uma fonte de proteínas. Observou-se que estatisticamente as formulações não apresentaram diferença significativa ($p > 0,05$) em

relação ao teor de proteínas. Este resultado procede, tendo em vista que as frutas não são consideradas fontes de proteínas (RODRÍGUEZ *et al.*, 2020), o que não contribui para o aumento do teor de proteínas. Evangelista *et al.* (2018) encontraram 1,7% de proteína na polpa de araticum. Observou-se, que o aumento de polpa de adicionada as formulações ocasionava redução do teor de proteínas e tal redução não foi considerada estatisticamente significativa.

As formulações por terem sido elaboradas com leite desnatado já era esperado o baixo teor de lipídios obtidos. Além disso, a adição de polpa de araticum não contribuiu com o aumento do teor de lipídios, tendo em vista que frutas em geral não são fontes de lipídios. Arruda *et al.* (2019) encontraram 3,78% em polpa de araticum congelada. O mesmo percentual também foi obtido por Evangelista *et al.* (2018). Já Damiani *et al.* (2011) obteve um menor percentual de lipídios (2,36%) em polpa de araticum fresca. No entanto, pequenas variações no teor de lipídios nas formulações foram observadas e tais variações são consideradas estatisticamente significativas.

Nas quatro formulações não foi possível detectar a presença de fibra bruta. Em geral, dentre os tipos de fibra presente em frutas, a fibra bruta é a que encontrada em menor percentual. Silva *et al.* (2017) analisaram o teor de fibra bruta da fruta araticum e encontraram 4% de fibra bruta. Este resultado demonstra que o teor de fibra bruta do araticum é baixo e pode ser explicado pela utilização de menores percentuais de polpa, no preparo das formulações (F1, F2 e F3). Tal fato pode ter contribuído para não detecção de valores de fibra bruta.

O araticum é uma fruta fibrosa, em que outros tipos de fibras são encontrados em maiores percentuais. Evangelista *et al.* (2018) analisaram a polpa de araticum, e encontraram 21,62% de fibra alimentar total, sendo 16,03% de fibra alimentar insolúvel e 5,59% de fibra alimentar solúvel. Corrêa *et al.* (2011) analisaram polpa de araticum liofilizada e encontraram 20,23 g/100 g de fibra total, sendo 11,47 g/100g de fibra solúvel e 8,76 g/ 100 g de fibra insolúvel.

Além disso, as formulações contendo araticum foram coadas em voil, o que pode ter ocasionado retenção de fibras, podendo ser considerado uns dos fatores responsáveis pela não detecção de fibra bruta nas formulações.

Em relação ao teor de cinzas, estatisticamente as formulações não apresentaram diferença significativa ($p < 0,05$) entre si, apesar de observamos um aumento do percentual de cinzas à medida que aumenta o percentual de polpa de araticum adicionado.

4.2 Viabilidade e sobrevivência de *L. plantarum* nas formulações liofilizadas durante o armazenamento

A viabilidade de *L. plantarum* nas formulações liofilizadas à base de leite e diferentes percentuais de araticum foram avaliadas durante 120 dias de armazenamento a 25°C (Tabela 2).

Tabela 2. Viabilidade e sobrevivência de *L. plantarum* nas formulações liofilizadas durante o armazenamento

Análises	Tempo (dias)	Formulações ¹			
		C	F1	F2	F3
Viabilidade (Log UFC mL ⁻¹)	0	10,39 ± 0,86 a	10,42 ± 0,86 a	10,48 ± 0,86 a	10,28 ± 0,86 a
	7	10,50 ± 0,33 a	10,45 ± 0,33 a	9,70 ± 0,33 ab	9,30 ± 0,33 b
	14	10,51 ± 0,54 a	10,44 ± 0,54 a	9,76 ± 0,54 a	9,57 ± 0,54 a
	21	10,20 ± 0,65 a	10,19 ± 0,65 a	9,53 ± 0,65 a	9,58 ± 0,65 a
	28	10,31 ± 0,49 a	9,98 ± 0,49 a	9,27 ± 0,49 a	9,61 ± 0,49 a
	120	9,48 ± 0,02 a	7,45 ± 0,02 b	7,28 ± 0,02 c	7,37 ± 0,02 b
Sobrevivência (%)	0	100,00 ± 2,23 a	100,00 ± 2,23 a	100,00 ± 2,23 a	100,00 ± 2,23 a
	7	100,00 ± 2,23 a	99,87 ± 2,23 a	92,56 ± 2,23 ab	90,49 ± 2,23 b
	14	100,00 ± 2,80 a	99,96 ± 2,80 a	93,15 ± 2,80 ab	92,87 ± 2,80 ab
	21	97,25 ± 3,07 a	97,39 ± 3,07 a	90,89 ± 3,07 ab	92,87 ± 3,07 b
	28	98,55 ± 3,22 a	95,70 ± 3,22 a	88,40 ± 3,22 b	93,47 ± 3,22 ab
	120	91,21 ± 3,30 a	71,48 ± 3,30 c	69,44 ± 3,30 c	71,72 ± 3,30 c

Formulações¹: C: 100% LDR; F1: 95% LDR +5% de araticum; F2: 90% LDR+10% de araticum; F3: 85% LDR+15% de araticum. Médias seguidas de mesma letra minúscula na coluna não diferem estatisticamente pelo teste Tukey a 5% de probabilidade; n = três repetições.

As quatro formulações apresentaram antes da liofilização uma população de *L. plantarum* de aproximadamente 10 unidades logarítmicas. Nas quatro formulações, após a liofilização, não se observou diferença significativa ($p > 0,05$) na viabilidade de *L. plantarum* mantendo a viabilidade na escala 10 unidades logarítmicas (Tabela 2). Este resultado demonstra que a adição de polpa de araticum nas formulações não causou decréscimo na viabilidade de *L. plantarum* após a liofilização.

No entanto, ao longo do armazenamento observou-se redução não significativa ($p > 0,05$) nas formulações com polpa de araticum (F1, F2 e F3), sendo F1 a formulação que obteve menor redução ($p < 0,05$) durante 21 dias de armazenamento (0,23 ciclos de log). Já F2 foi a formulação que apresentou maior redução (3,2 ciclos log) em relação às demais formulações, durante 120 dias de armazenamento, indicando que suplementação com polpa de araticum não protegeu o micro-organismo durante o armazenamento.

Barbosa *et al.* (2015) também não observaram redução da viabilidade das estirpes *Lactobacillus plantarum* 299v e *Pediococcus acidilactici* HA-6111-2 em suco de laranja em pó obtido pelo processo de liofilização. Já Araújo *et al.* (2020) observaram que as estirpes probióticas *Lactobacillus casei* L-26 e *Lactobacillus acidophilus* LA-05 liofilizadas em

matrizes alimentares constituídas de coprodutos do processamento industrial de frutas tropicais (acerola, caju e goiaba) apresentaram redução na viabilidade de aproximadamente uma unidade logarítmica após a liofilização.

Com 120 dias de armazenamento as quatro formulações apresentaram redução na viabilidade e sobrevivência. No entanto, a viabilidade de *L. plantarum* na formulação contendo somente leite (controle) foi significativamente ($p < 0,05$) maior do que nas demais formulações suplementadas com polpa de araticum. Tais resultados corroboraram com o estudo de Morgan *et al.* (2006), que analisou a viabilidade de culturas liofilizadas de *L. plantarum*, durante 150 dias de armazenamento. Foram utilizados leite desnatado, caseína e soro de leite, como crioprotetores, durante a liofilização e armazenamento, sendo o leite desnatado apontado como o melhor efeito protetor. O efeito protetor do leite desnatado já foi relatado em alguns estudos (VINDEROLA, 2019; JAGANNATH, 2010; MORGAN, 2006).

A redução da viabilidade de *L. plantarum* na formulação contendo apenas leite foi de aproximadamente 1 unidade logarítmica, enquanto nas formulações suplementadas com polpa de araticum foi de aproximadamente 3 unidades logarítmicas. O araticum é uma fruta que contém uma gama de substâncias bioativas que além de apresentar atividade antioxidante também pode apresentar atividade antimicrobiana (ARRUDA *et al.*, 2019). É provável que tais substâncias bioativas possam ter uma relação com a maior redução da viabilidade nas formulações suplementadas com a polpa.

Araújo *et al.* (2020) observaram uma redução em torno de 4 a 8 unidades logarítmicas na viabilidade das estirpes liofilizadas em coprodutos do processamento industrial de frutas tropicais (acerola, caju e goiaba) após 90 dias de armazenamento a 25°C. Tal redução na viabilidade comprometeu a funcionalidade do produto em pó pois, a população das duas estirpes foi inferior ao limite mínimo recomendado para um produto ser considerado probiótico. Os estudos com sucos de frutas probióticos em pó obtidos pelo processo de liofilização são bem escassos. No entanto, os poucos estudos disponíveis na literatura demonstram o desafio em manter a viabilidade de probióticos em suco de frutas em pó.

Após liofilização, todas as formulações apresentaram 100% de sobrevivência. Houve decréscimo significativo ($p < 0,05$) nas taxas de sobrevivência em todas as formulações, com o prolongamento do período de armazenamento. No entanto, a diminuição nos primeiros 120 dias de armazenamento foi a mais proeminente, com uma redução de 30,56% de sobrevivência na formulação F2. A menor redução da sobrevivência foi observada na formulação elaborada apenas com leite desnatado (8,79%), seguida de F1 (28,52%), F2 (30,56%) e F3 (28,28%).

Observou-se que em todas as formulações a população de *L. plantarum* apresentou decréscimo ao longo do período de armazenamento que é descrito pela equação de primeiro grau (Figura 1 e Tabela 3).

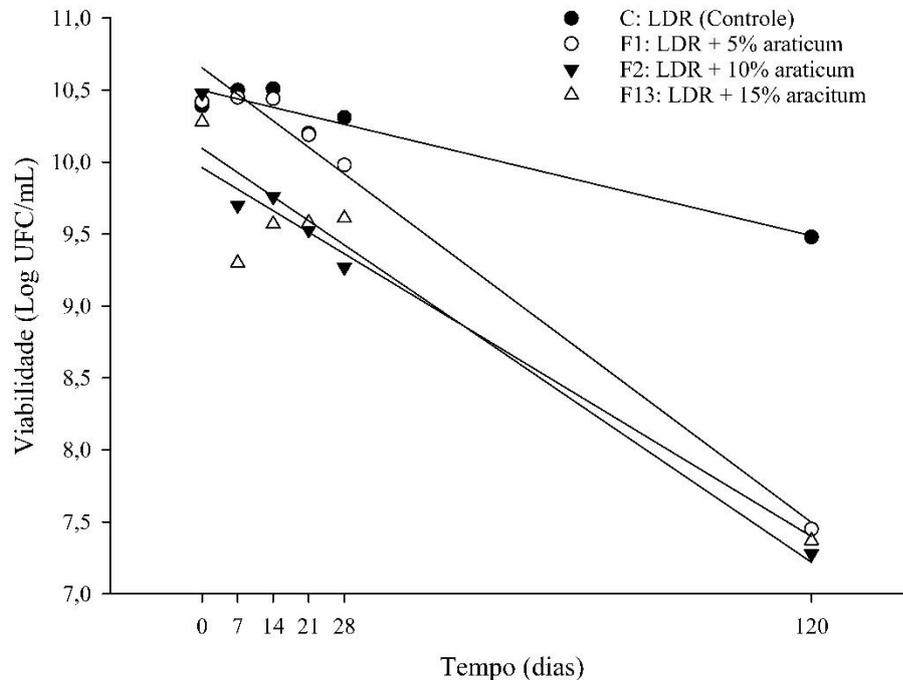


Figura 1. Estabilidade de *L. plantarum* SBR 64.7 durante o armazenamento (0, 7, 14, 21, 28 e 120 dias) a 25° C.

Tabela 3. Equações de regressão, valor R^2 e erro padrão da média da viabilidade de *L. plantarum* nas formulações durante o armazenamento de 120 dias

Formulações ¹	Equações	R^2	EPM
C	$\hat{y} = 10,4981 - 0,0084x$	0,93	0,11
F1	$\hat{y} = 10,6553 - 0,0263x$	0,98	0,15
F2	$\hat{y} = 10,9556 - 0,0240x$	0,96	0,24
F3	$\hat{y} = 9,9612 - 0,0214x$	0,91	0,33

Formulações¹: C: 100% LDR; F1: 95% LDR +5% de araticum; F2: 90% LDR+10% de araticum; F3: 85% LDR+15% de araticum. Médias seguidas de mesma letra minúscula na coluna não diferem estatisticamente pelo teste Tukey a 5% de probabilidade; n = três repetições. EPM: Erro Padrão da Média.

O valor de R^2 para todas as formulações foi superior a 0,90 o que demonstra que o modelo linear foi bem ajustado.

Observou-se que F1 foi a formulação que apresentou maior valor de R^2 (0,98), indicando-nos que a suplementação com 5% de polpa de araticum parece ter sido a que mais protegeu o micro-organismo. No entanto, não é possível afirmar que a adição de polpa de

araticum foi o único fator responsável a manter a viabilidade da estirpe *L.plantarum* SBR 64-7 durante o armazenamento, haja visto não ter havido controle de outros fatores extrínsecos responsáveis pela manutenção da estabilidade do micro-organismo.

Segundo Broeckx *et al.* (2016), os probióticos devem ser protegidos não apenas durante o processo de liofilização, mas também durante o armazenamento. Estes mesmos autores ainda afirmam que, juntamente com o tipo de protetor usado durante a liofilização outros fatores devem ser levados em consideração durante o armazenamento, como por exemplo, a umidade residual do pó, o nível de oxigênio atmosférico, umidade relativa e temperatura.

Jofré *et al.* (2015) observaram que em 39 semanas de armazenamento a 4° C as estirpes probiótica (*Lactobacillus casei/paracasei* CTC1677, *Lactobacillus casei/paracasei* CTC1678 e *Lactobacillus rhamnosus* CTC1679) desidratadas somente em leite ou suplementadas com trealose ou lactose apresentaram menores reduções na viabilidade em relação às armazenadas a 22° C. Na temperatura de 4° C a redução da viabilidade foi apenas de 0,9 unidades logarítmicas, enquanto uma perda máxima de 8 unidades logarítmicas foi observada quando armazenadas a 22° C. No caso da estirpe *L. plantarum* SBR64.7 o armazenamento a 25° C por 120 dias (16 semanas) pode ser considerado uns dos fatores que levaram ao decréscimo da viabilidade durante o armazenamento. Broeckx *et al.* (2016) reforçam que os produtos liofilizados precisam ser armazenados abaixo da temperatura de transição vítrea, onde podem manter um estado vítreo. No entanto, em alguns países, como no Brasil, os suplementos probióticos são comercializados a temperatura ambiente.

Além da temperatura de armazenamento, a atividade de água (aw) de amostras liofilizadas é considerado outro fator a afetar a estabilidade dos probióticos durante o armazenamento. Embora nesse estudo não tenhamos avaliado a aw das formulações é provável que apresentem valores de aw distintos, visto que se trata de formulações distintas que foram submetidas ao mesmo tempo de liofilização. De acordo com Aschenbrenner *et al.* (2012), a taxa de inativação dos probióticos é maior com o aumento da aw e temperatura. Zayed & Ross (2004) observaram que o armazenamento de *Lactobacillus salivarius* subsp. *salivarius* UCC 500 na forma liofilizada em umidades de 2,8% e 5,6% apresentaram resultados de viabilidade mais altos do que os pós armazenados a uma umidade relativa de 8,8%. Como a água pode atuar como plastificante, tal condição poderá diminuir a temperatura de transição vítrea, limitando a estabilidade do armazenamento (BROECKX *et al.*, 2016).

O nível de oxigênio durante o armazenamento também é outro fator que está envolvido com a perda de viabilidade. As formulações contendo *L. plantarum* foram armazenadas em

frascos de vidro que foram vedados com tampa de borracha e lacre de alumínio. Embora este cuidado tenha sido tomado no experimento, o nível de oxigênio não foi controlado na estufa onde os frascos foram armazenados. Tal condição também pode estar associada com o decréscimo de viabilidade de *L. plantarum* durante o armazenamento. KurtMann *et al.* (2009) verificaram que *Lactobacillus acidophilus* La-5, na forma liofilizada, quando armazenado em baixos níveis de oxigênio (< 4%) a viabilidade foi maior do que quando esta cepa foi armazenada em níveis de oxigênio atmosférico.

4.3. Viabilidade e sobrevivência de *L. plantarum* nas diferentes formulações após exposição às condições do trato gastrointestinal *in vitro*.

A viabilidade e sobrevivência de *L. plantarum* nas quatro formulações liofilizadas foi avaliada após exposição às condições simuladas *in vitro* do trato gastrointestinal (Tabela 4).

Tabela 4 – Viabilidade e sobrevivência de *L. plantarum* SBR 64.7 nas diferentes formulações após exposição às condições do trato gastrointestinal *in vitro*.

Análises	Formulações ¹	Tratamentos		
		Suco gástrico (JG)	Suco intestinal (JI)	Sucessivo (JG + JI)
Viabilidade (Log UFC mL ⁻¹)	C	9,30 ± 0,09 a	9,02 ± 0,09 b	9,02 ± 0,09 b
	F1	9,28 ± 0,09 a	9,11 ± 0,09 a	8,57 ± 0,09 b
	F2	9,54 ± 0,09 a	8,93 ± 0,09 b	8,51 ± 0,09 c
	F3	8,98 ± 0,09 a	8,77 ± 0,09 bc	8,53 ± 0,09 c
Sobrevivência (%)	C	99,75 ± 1,11 a	96,96 ± 1,11 b	96,88 ± 1,11 ab
	F1	99,24 ± 1,11 a	98,38 ± 1,11 a	92,59 ± 1,11 b
	F2	100,00 ± 1,11 a	98,38 ± 1,11 a	93,53 ± 1,11 b
	F3	97,86 ± 1,11 a	95,59 ± 1,11 ab	93,21 ± 1,11 b

Formulações¹: C:100% LDR; F1: 95% LDR +5% de araticum; F2: 90% LDR+10% araticum; F3: 85% LDR+15% de araticum. Médias seguidas de mesma letra minúscula na coluna não diferem estatisticamente pelo teste Tukey a 5% de probabilidade; n = três repetições.

Observa-se que todas as formulações quando submetidas aos tratamentos (suco gástrico, suco intestinal e sucessivo) apresentaram redução da viabilidade, em relação ao controle, inferior a uma unidade logarítmica. Este resultado demonstra que a polpa de araticum não comprometeu a viabilidade de *L. plantarum* após exposição às condições simuladas *in vitro* do trato gastrointestinal.

Estatisticamente, a tolerância de *L. plantarum* nas quatro formulações foi significativamente maior ($p < 0,05$) no tratamento com suco gástrico, seguido do suco intestinal e sucessivo. O percentual de sobrevivência demonstrou comportamento similar a viabilidade.

Leandro *et al.* (2021) observaram que *L. plantarum* SBR64.7 na forma de cultura fresca em solução salina 0.85% apresentou decréscimo de viabilidade de uma unidade logarítmica após exposição ao suco gástrico por 3 horas. O mesmo comportamento também foi observado quando *L. plantarum* SBR64.7 foi exposto ao suco intestinal por 4 horas. Este resultado demonstra que esta estirpe apresenta uma tolerância intrínseca ao suco gástrico e intestinal.

Em algumas estirpes de bactérias lácticas, a tolerância às condições ácidas está associada com a presença de mecanismos que incluem bombas de prótons, produção de substâncias alcalinas no citoplasma, alterações na membrana celular e proteção ou reparo de macromoléculas (WU *et al.*, 2013). Hung *et al.* (2016) verificaram que *Lactobacillus plantarum* ZDY2023 quando exposto em condições ácidas passou a exibir uma estratégia de adaptação complexa para lidar com o estresse ácido, alterando a biossíntese de ácidos graxos, regulando o nível de transcrição de genes associados à glicólise e bombas de prótons, produzindo substâncias alcalinas e melhorando a precisão translacional e o dobramento de proteínas, bem como modulando redes de regulação transcricional. É possível que a tolerância intrínseca de *L. plantarum* SBR64.7 ao suco gástrico esteja associada a pelo menos um desses mecanismos observados em *L. plantarum* ZDY2023.

Os sais biliares fazem parte do suco intestinal e a resistência dos probióticos aos sais biliares é crítica para sua sobrevivência no trato intestinal. A hidrólise de sais biliares catalisa a desconjugação de sais biliares conjugados e acredita-se que esteja envolvida na resistência aos sais biliares (WANG *et al.*, 2021). Esses mesmos autores observaram que a presença dos genes *bsh 1* e *bsh 3*, envolvidos na hidrólise de sais biliares, são necessários para tolerância de *Lactobacillus plantarum* AR113 aos sais biliares. Leandro *et al.* (2021) não observaram em *L. plantarum* SBR64.7 atividade da enzima hidrolase de sais biliares em meio de cultura. A análise molecular será necessária para verificar se realmente essa estirpe não apresenta genes *bsh*.

4.4 Atividade antimicrobiana das formulações liofilizadas

As quatro formulações liofilizadas contendo *L. plantarum* foram avaliadas no 14º dia de armazenamento quanto a atividade antimicrobiana contra as bactérias patogênicas *E. coli*, *S. aureus* e *Salmonella* (Figura 2).

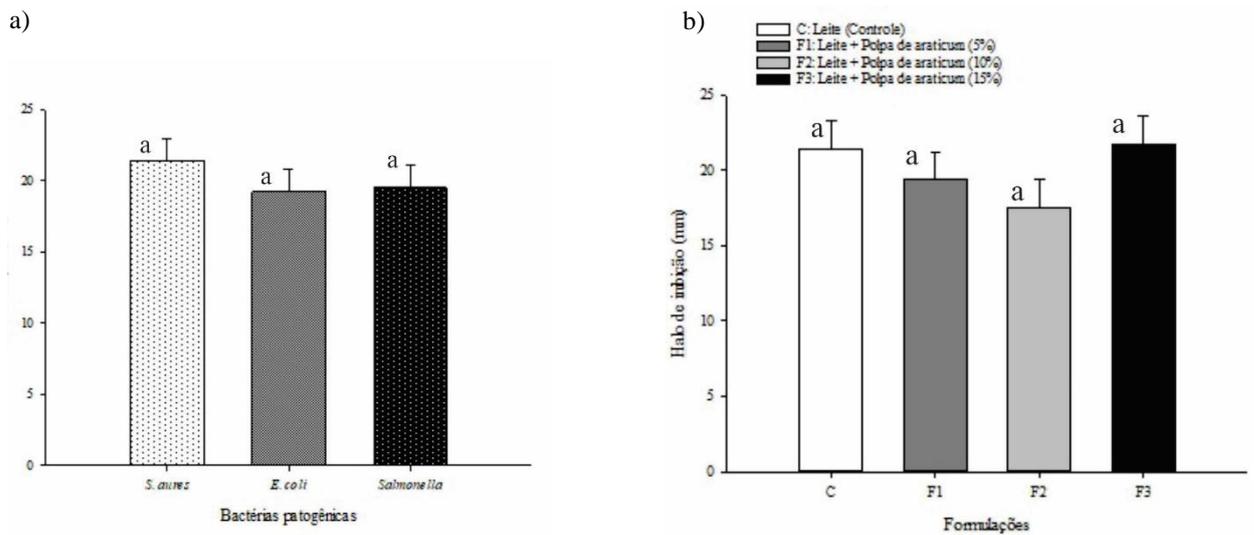


Figura 2. Atividade antimicrobiana das formulações liofilizadas contendo *L. plantarum* SBR 64.7 contra as bactérias *E. coli*, *S. aureus* e *Salmonella*

Observou-se que o tipo de formulação não afetou de forma significativa ($p < 0,05$) o diâmetro do halo de inibição nas três bactérias patogênicas (Figura 2 a). Este resultado foi importante para demonstrar que a adição de polpa de araticum nas formulações não comprometeu a funcionalidade de *L. plantarum* com relação a atividade antimicrobiana.

Observa-se que independente da bactéria patogênica as formulações não apresentaram diferença significativa ($p < 0,05$) com relação ao diâmetro do halo de inibição (Figura 2 b).

Leandro *et al.* (2020) avaliaram a atividade antimicrobiana de *L. plantarum* SBR64.7, como cultura fresca, e os resultados obtidos foram similares aos obtidos neste estudo. Este resultado demonstra que a cultura no 14º dia de armazenamento não apresenta atividade antimicrobiana comprometida devido a adição de polpa de araticum. Além disso, este resultado demonstra que a estirpe apresenta tolerância ao processo de liofilização.

As bactérias lácticas durante o crescimento liberam várias substâncias com ação antimicrobiana, tais como, ácido láctico, acético e em algumas estirpes é observada a liberação de peróxido de hidrogênio e bacteriocina (LEROY & DE VUYST, 2004). A manutenção desta funcionalidade é muito importante em formulações liofilizadas destinadas ao consumo humano ou animal pois, tal atividade é necessária para os probióticos se estabelecerem na mucosa intestinal para que possam proporcionar benefícios ao hospedeiro.

4.5. Atividade antioxidante das formulações liofilizadas

As formulações liofilizadas à base de leite e polpa de araticum foram analisadas quanto à atividade antioxidante pelos métodos DPPH• e FRAP (Tabela 5).

Tabela 5. Atividade antioxidante de formulações liofilizadas à base de leite e com adição de polpa de araticum durante o período de armazenamento

Formulações ¹	Tempo de armazenamento (dias)	DPPH•	FRAP
		RDSC $\mu\text{mol TROLOX/mL}$ bebida liofilizada	($\mu\text{mol TROLOX/mL}$ bebida liofilizada)
F1	0	2297,96 \pm 650,71 c	0,490 \pm 0,014 a
	14	2920,65 \pm 568,34 a	0,539 \pm 0,097 a
	28	2492,92 \pm 586,75 b	0,477 \pm 0,087 a
F2	0	5051,60 \pm 404,50 c	0,890 \pm 0,090 a
	14	5206,35 \pm 276,05 b	0,920 \pm 0,034 a
	28	5313,36 \pm 290,56 a	0,932 \pm 0,153 a
F3	0	6088,51 \pm 883,42 c	1,097 \pm 0,184 a
	14	6180,64 \pm 1006,07 b	1,075 \pm 0,044 a
	28	6274,97 \pm 445,50 a	1,165 \pm 0,080 a

Formulações¹: F1: 95% LDR +5% de polpa de araticum; F2: 90% LDR+10% polpa de araticum; F3: 85% LDR+15% de polpa araticum. Médias seguidas de mesma letra na coluna não diferem estatisticamente pelo teste Tukey ($p>0,05$); $n = 3$.

RDSC: capacidade de eliminação de radicais

A adição de polpa de araticum ao leite aumentou o potencial antioxidante das formulações liofilizadas, sendo esse aumento proporcional a concentração de polpa de araticum adicionada nas formulações F1 (5%) e F2 (10%). O mesmo não ocorreu com a formulação (F3).

É possível que devido ao maior teor de polpa de araticum, presente em F3, e a forma de preparo da formulação, em que, primeiramente, uma diluição da polpa de araticum foi feito em LDR e, posteriormente, a filtração em voil, tenha havido maior retenção no teor de resíduo da polpa de araticum, com conseqüente retenção dos compostos bioativos da fruta. A adição de 15% polpa de araticum teve o maior impacto na atividade antioxidante, independentemente do método utilizado para sua determinação.

A formulação F3 exibiu o maior valor de DPPH• (6274,97 $\mu\text{mol TROLOX/mL}$) e FRAP de (1,165 $\mu\text{mol TROLOX/mL}$) (Tabela 4). Por outro lado, notou-se que F1 apresentou o menor valor de FRAP, o que já era esperado, já que F3 apresentava 15% de polpa de araticum, enquanto F1 apresentava 5% e os compostos fenólicos e flavonoides presentes nas frutas são considerados os principais responsáveis pela atividade antioxidante (SETHIYA *et al.*, 2014).

Trabalhos anteriores demonstraram (ARRUDA *et al.*, 2019; EVANGELISTA *et al.*, 2018; JUSTINO *et al.*, 2016) que a polpa do araticum é rica em compostos fitoquímicos, os quais apresentam atividade antioxidante, como carotenoides, compostos fenólicos, tocoferóis.

É possível que o conteúdo de compostos fenólicos ou compostos bioativos, presentes no araticum, seja responsável pela eliminação da maioria dos radicais livres nos ensaios FRAP e DPPH[•]. Logo, pode-se esperar que os compostos fenólicos, presentes no araticum, possam ter sido os principais contribuinte da atividade antioxidante nas formulações.

De acordo com a Tabela 4, a atividade antioxidante oscilou no decorrer de 28 dias de armazenamento, ora aumentando, ora diminuindo, a depender da formulação, tanto pelo método DPPH[•] como FRAP. No entanto, a maioria dos estudos (LI ZHEN-DENG *et al.*, 2022; ZAHID *et al.*, 2022; GEBCZYŃSKI *et al.*, 2017), demonstraram redução na atividade antioxidante ao longo do período de armazenamento.

Em nosso estudo, o aumento da atividade antioxidante pode ser devido à elevada capacidade antioxidante da polpa de araticum, associado ao leite desnatado reconstituído a 10%, presente nas 3 formulações (F1, F2 e F3), que pode ter estimulado as interações entre as proteínas do leite e os componentes fenólicos, aumentando a atividade antioxidante (TRIGUEROS *et al.*, 2014). Segundo Trigueros *et al.* (2014), iogurtes enriquecidos com suco de romã demonstraram uma tendência em aumentar a atividade antioxidante durante 28 dias de armazenamento.

Outro fator importante a ser considerado foi o tempo de armazenamento, de apenas 28 dias. É possível que, apesar de ter havido diferença significativa ($p < 0,05$) entre as formulações ao longo do armazenamento, biologicamente, a diferença tenha sido pequena. Haja visto, nossas formulações serem liofilizadas e o micro-organismo encontrar-se inativado, com atividade microbiana reduzida ou até mesmo interrompida (ZAHID *et al.*, 2022). Aliado a esse fator, o curto tempo de reconstituição pode não ter ativado totalmente o micro-organismo, o que acabou por influenciar na atividade antioxidante.

Além do curto tempo de armazenamento, não foram avaliados fatores extrínsecos como: condições de embalagem, exposição à luz, umidade residual do pó, teor de oxigênio, umidade relativa e atividade de água, ocasionando, portanto, oscilação na atividade antioxidante das formulações (RASCÓN *et al.*, 2018; BROECKX *et al.*, 2016; ASCHENBRENNER *et al.*, 2012; KURTMANN *et al.*, 2009).

Li Zhen-Deng *et al.* (2022) avaliaram os efeitos de diferentes temperaturas (4, 15, 25 e 35° C), embalagem (vácuo e pressão normal) e exposição à luz/escuridão em damascos desidratados, durante 6 meses de armazenamento. Foi observado que a temperatura e o tempo de armazenamento tiveram efeito significativo ($p < 0,05$) na capacidade antioxidante dos damascos secos. Após 6 meses de armazenamento, a 25° C, observou-se redução de 23% para

DPPH• e 17% para FRAP e que mudanças de DPPH• e FRAP compartilharam tendências semelhantes.

Quando comparados os métodos de determinação da atividade antioxidante, algumas diferenças podem ser observadas entre os dados, provavelmente devido a diferentes preparações de amostras, extração e procedimentos de hidrólise (SAHINGIL, D.; HAYALOGLU, AA, 2022).

Alothman *et al.* (2009), ao comparar os ensaios FRAP e DPPH• para análise de frutas tropicais (banana, abacaxi e goiaba), encontraram correlações significativas ($p < 0,01$), entre os dois métodos, apesar de mencionar que o método FRAP é comumente usado para estudar a capacidade antioxidante de materiais vegetais. Dessa maneira, pode-se inferir não ter havido diferença significativa ($p > 0,05$) na análise FRAP, devido a nossas formulações utilizarem percentual variável de leite e polpa de araticum, e não apenas polpa de araticum.

O araticum é rico em compostos fenólicos e seus efeitos benéficos podem ser potencializados pela ação dos probióticos. Os efeitos estimuladores dos compostos fenólicos nos probióticos podem estar associados às suas propriedades antioxidantes e de eliminação de radicais livres. Já os múltiplos grupos hidroxila presentes nos compostos fenólicos permitem a ocorrência de interações proteína-proteína. Tal achado, pode ter sido responsável pelo aumento na atividade antioxidante entre a matriz láctea e diferentes percentuais da polpa de araticum (ARRUDA *et al.*, 2019; SOUZA *et al.*, 2018).

No entanto, mais estudos são necessários para confirmar as interações benéficas entre diferentes compostos fenólicos presentes na polpa de araticum e a estirpe potencialmente probiótica *L. plantarum* SBR 64.7, a fim de confirmar sua atuação como agente antimicrobiano ou como agente protetor.

5. CONCLUSÃO

A adição de polpa de araticum ao leite aumentou o teor de carboidratos em todas as formulações, não alterou o teor de proteínas, lipídios e cinzas e reduziu a umidade devido à menor disponibilidade de água livre apresentado pelas formulações.

A estirpe *L. plantarum* SBR 64.7 apresentou tolerância à liofilização, o que reforça o seu potencial probiótico. A adição de polpa de araticum não reduziu e nem acentuou a sobrevivência desta estirpe após a liofilização. No entanto, com 120 dias de armazenamento observou-se uma redução da viabilidade em todas as formulações, sendo que as adicionadas com polpa de araticum apresentaram um decréscimo mais acentuado da viabilidade.

A adição de polpa de araticum não comprometeu a viabilidade de *L. plantarum* após exposição às condições simuladas *in vitro* do trato gastrointestinal, nem comprometeu a funcionalidade de *L. plantarum* com relação a atividade antimicrobiana.

O potencial antioxidante das formulações liofilizadas aumentou, à medida em que aumentou o percentual de polpa de araticum, sendo F3 a formulação que obteve o maior impacto na atividade antioxidante.

Diante dos resultados obtidos, concluímos que mais estudos devem ser realizados para melhor caracterizar o efeito da adição da polpa de araticum na viabilidade de *L. plantarum* em formulações liofilizadas, tendo em vista, que análises de umidade e atividade de água não foram realizadas. Além disso, alguns fatores extrínsecos como taxa de oxigênio, teor de umidade e luz não foram controlados, durante o armazenamento.

6. REFERÊNCIAS

- ABDELAZEZ *et al.* Potential benefits of *Lactobacillus plantarum* as probiotic and its advantages in human health and industrial applications: A review. **Advances in Environmental Biology**, 12(1), p.16-27, 2018.
- ALBUQUERQUE *et al.* Utilization of powdered fruit pulp probiotic loaders as a functional food: general aspects and perspectives. **Brazilian Journal of Food Technology**, v. 24, p.1 -11, 2021.
- ALONGI, M., ANESE, M. Re-thinking functional food development through a holistic approach. **Journal of Functional Foods**, v.81, 1-13, 2021.
- ALOTHMAN *et al.* Antioxidant capacity and phenolic content of selected tropical fruits from Malaysia, extracted with different solvents. **Food Chemistry**, v. 115, p. 785–788, 2009.
- AOAC - ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS.** Official Methods of Analysis of the AOAC. 18th ed. Gaithersburg, M.D, USA. 2005.
- ARAÚJO *et al.* Protective effects of tropical fruit processing coproducts on probiotic *Lactobacillus* strains during freeze-drying and storage. **Microorganisms**, 9(8), 1-15, 2020.
- ARELLANO-AYALA, K., LIM, J., YEO, S., BUCHELI, J., TODOROV, D., YOSEP, J.I., HOLZAPFEL, W. Rehydration before application improves functional properties of lyophilized *Lactiplantibacillus plantarum* HAC03. **Microorganisms**, 9, 1-21, 2021.
- ARRUDA, H.; SILVA, E.; PEREIRA, G.; ANGOLINI, C.; EBERLIN, M.; MEIRELES, M.; PASTORE, G. Effects of high-intensity ultrasound process parameters on the phenolic compounds recovery from araticum peel. **Ultrasonics – Sonochemistry**, p. 82-95, 2019.
- ARRUDA, H.; SILVA, E.; PASTORE, G. Araticum (*Annona crassiflora* Mart.) as a source of nutrients and bioactive compounds for food and non-food purposes: A comprehensive review. **Food Research International**, v. 123, p. 450-480, 2019.
- ARRUDA, H.; SILVA, E.; PEREIRA, G.; MORAIS, D.; EBERLIN, M.; PASTORE, G. Determination of free, esterified, glycosylated and insoluble-bound phenolics composition in the edible part of araticum fruit (*Annona crassiflora* Mart.) and its by-products by HPLC-ESI-MS/MS. **Food Chemistry**, v. 245, p. 738-749, 2018.
- ASCHENBRENNER *et al.* Evaluation of the relevance of the glassy state as stability criterion for freeze-dried bacteria by application of the Arrhenius and WLF model. **Criobiology**, v. 65, p. 308-318, 2012.
- ASSEGEHEGN, G.; BRITO-DE LA FUENTE, E.; FRANCO, J.M.; GALLEGOS, C. The importance of understanding the freezing step and its impact on freeze-drying process performance. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, 108, 1378-1395, 2019.
- BAILÃO, E; DEVILLA, I. ; CONCEIÇÃO DA, E.; BORGES, L. Bioactive compounds founds in Brazilian cerrado fruits. **International Journal of Molecular Sciences**, 16, 23761-23783, 2015.

BARBOSA *et al.* Comparison of spray drying, freeze drying and convective hot air drying for the production of a probiotic orange powder. **Journal of Functional Foods**, v.17, p. 340–351, 2015.

BASHOLLI-SALIHU *et al.* Effect of lyoprotectants on b-glucosidase activity and viability of *Bifidobacterium infantis* after freeze-drying and storage in milk and low pH juices. **LWT- Food Science and Biotechnology**, v. 57, p. 276 -282, 2014.

BAUTISTA-GALLEGO, J. *et al.* Screening of lactic acid bacteria isolated from fermented table olives with probiotic potential. **Food Research International**, v. 50, n. 1, p. 135–142, 2013

BELLALIA, S; KHALILB, J. B.; FONTANINIB, A; RAOULTA, D.; LAGIER JC. A new protectant medium preserving bacterial viability after freeze-drying. **Microbiological Research**, 236, 2020.

BELLIS *et al.* Probiotic bacteria and plant-based matrices: An association with improved health-promoting features. **Journal of Functional Foods**. v. 87, p. 1-13, 2021.

BENZIE, I; STRAIN, J. The Ferric Reducing Ability of Plasma (FRAP) as a Measure of “Antioxidant Power: The FRAP Assay”. **Analytical Biochemistry**, v.239, p. 70-76, 1996.

BETORET *et al.* Effect of drying process, encapsulation, and storage on the survival rates and gastrointestinal resistance of *L. salivarius* spp. *salivarius* included into a fruit matrix. **Microorganisms**. v. 8, p. 1-12, 2020.

BORGONOVI *et al.* Fruit bioactive compounds: Effect on lactic acid bacteria and on intestinal microbiota. **Food Research International**, v. 161, p.1-23, 2022.

BRAND-WILLIAMS, W; CUVELIER, E; BERSET, C. Use of a Free Radical Method to Evaluate Antioxidant Activity. **LWT**, v. 28, p. 25-30, 1995.

BRASIL, MAPA – Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, **Portaria Interministerial MAPA/MMA, nº 10 de 21 de julho de 2021**. Institui lista de espécies nativas da sociobiodiversidade de valor alimentício, para fins de comercialização in natura ou de seus produtos derivados. Disponível em: <https://in.gov.br/en/web/dou/-/portaria-interministerial-mapa/mma-n-10-de-21-de-julho-de-2021-333502918>. Acesso em: 03 de dezembro de 2021.

BRASIL, ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Instrução Normativa - IN nº 102, de 15 de outubro de 2021**. Altera a Instrução Normativa nº 28, de 26 de julho de 2018, que estabelece as listas de constituintes, de limites de uso, de alegações e de rotulagem complementar dos suplementos alimentares. Disponível em: http://antigo.anvisa.gov.br/documents/10181/6254004/IN_102_2021_.pdf/855785e7-43cc-438b-aa6a-7893e26afdd2. Acesso em: 11 de janeiro de 2023.

BRASIL, ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Instrução Normativa - IN nº 76, de 5 de novembro de 2020**. Dispõe sobre a atualização das listas de constituintes, de limites de uso, de alegações e de rotulagem complementar dos suplementos alimentares. Disponível em:

http://antigo.anvisa.gov.br/documents/10181/5809185/IN_76_2020_COMP.pdf/28f071f8-8079-4671-a1ec-b47c8dd30917. Acesso em: 11 de janeiro de 2023.

BRASIL, MAPA – Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Instrução Normativa nº 53 de 01 de outubro de 2018**. Institui o regulamento técnico Mercosul de identidade e qualidade do leite em pó. Disponível em: https://www.in.gov.br/materia/-/asset_publisher/Kujrw0TZC2Mb/content/id/45374372/do1-2018-10-16-instrucao-normativa-n-53-de-1-de-outubro-de-2018-45374042. Acesso em: 21 de dezembro de 2021.

BRASIL, ANVISA – Agência Nacional De Vigilância Sanitária, **Resolução RDC nº 241, 26 de julho de 2018**. Requisitos para comprovação da segurança e dos benefícios à saúde dos probióticos para uso em alimentos, Disponível em: https://www.in.gov.br/materia/-/asset_publisher/Kujrw0TZC2Mb/content/id/34379910/do1-2018-07-27-resolucao-da-diretoria-colegiada-rdc-n-241-de-26-de-julho-de-2018-34379900. Acesso em: 13 de maio de 2021.

BRASIL, ANVISA – Agência Nacional De Vigilância Sanitária. **Portaria nº 398 de 30 de abril de 1999**. Estabelece as diretrizes básicas para análise e comprovação de propriedades funcionais e/ou de saúde alegadas em rotulagem de alimentos. Disponível em: https://bvsms.saude.gov.br/bvs/saudelegis/anvisa/1999/prt0398_30_04_1999.html. Acesso em: 13 de maio de 2021.

BROECKX *et al.* Drying techniques of probiotic bacteria as an important step towards the development of novel pharmabiotics. **International Journal of Pharmaceutics**, v.505, p. 303-318, 2016.

BROWN, *et al.* Functional foods as potential therapeutic options for metabolic syndrome. **Obesity Reviews**, v.16, p. 914–941, 2015.

CARPI, *et al.* Comprehensive pan-genome analysis of *Lactiplantibacillus plantarum* complete genomes. **Journal of Applied Microbiology**, p 1-13, 2021.

CARVALHO, *et al.* Relevant factories for the preparation of freeze-dried lactic acid bacteria. **International Dairy Journal**, p 835-847, 2004.

CASSID, *et al.* Effect of soluble dietary fibre on postprandial blood glucose response and its potential as a functional food ingredient. **Journal of Functional Foods**, v. 46, p. 423–439, 2018.

CHALUPA-KREBZDAK *et al.* Nutrient density and nutritional value of milk and plant-based milk alternatives. **International Dairy Journal**, v. 87, p. 84-92, 2018.

CHAMPAGNE *et al.* Recommendations for the viability assessment of probiotics as concentrated cultures and in food matrices. **International Journal of Food Microbiological**, v. 149, 185-193, 2011.

CHATURVEDI *et al.* The potential of non-dairy symbiotic instant beverage powder: Review on a new generation of healthy ready-to-reconstitute drinks. **Food Bioscience**, v. 42, p.1-11, 2021.

CHAUDHARY *et al.* Probiotics- its functions and influence on the ageing process: A comprehensive review. **Food Bioscience**, p. 1-39, 2023.

CHENG, Z; MOORE, J; YU, L. High-throughput relative DPPH radical scavenging capacity assay. **Journal of agricultural and Food Chemistry**, v. 54, p. 7429-7436, 2006.

CONGO, *et al.* Immune-Boosting Functional Foods: A Potential Remedy for Chinese Consumers Living Under Polluted Air. **Red Fame**, v.6, 12-27, 2020.

CORBO, M.R, BEVILACQUA A., PETRUZZI L.; CASANOVA, F., SINIGAGLIA M. Functional beverages: the emerging side of functional foods commercial trends, research, and health implications. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, 13 1-15, 2014.

CORRÊA *et al.* 2011. Evaluation of dehydrated marolo (*Annona crassiflora*) flour and carpels by freeze-drying and convective hot-air drying. **Food Research International**, v. 44, p. 2385-2390, 2011.

CUI *et al.* Effects of different drying methods on quality, bacterial viability and storage stability of probiotic enriched apple snacks. **Journal of Integrative Agriculture**, v. 17, p. 247-255, 2018.

CZUBINSK. J & DWIECKI.K. A review of methods used for investigation of protein–phenolic compound interactions. **International Journal of Food Science and Technology**, p.1-13, 2016.

DAMIANI *et al.* Characterization of fruits from the savanna: araçá (*Psidium guinnensis* Sw.) and marolo (*Annona crassiflora* Mart. **Food Science and Technology**, v.31(3), p.723-729,2011.

DOS SANTOS, Maria Carolina Mesquita. **Bebida de grão-de-bico e coco fermentada por *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei* LBC 81 elaborada com diferentes teores de açúcar.** Profa. Dra. Raquel Braz Assunção Botelho.98f. Dissertação (Mestrado) – Pós-Graduação em Nutrição Humana, Departamento de Nutrição, UNB, Brasília, 2020.

ECHEGARAY *et al.* A novel approach to *Lactiplantibacillus plantarum*: From probiotic properties to the omics insights. **Microbiological Research**, v.268, p 1-13, 2023.

EVANGELISTA *et al.* Fruits from the Brazilian Cerrado region: physico-chemical characterization, bioactive compounds, antioxidant activities, and sensory evaluation. **Food Chemistry**, v. 245, p. 305-311, 2018.

FAO/WHO. Food and Agriculture Organization of the United Nations and World Health Organization. Evaluation of health and nutritional properties of powder milk and live lactic acid bacteria, 2001.

FARID *et al.* Comparative Study of Functional Food Regulations in Japan and Globally. **Global Journal of Health Science**, v. 11 (6), p. 132-145, 2019

FOGLIAA, C; ALLESINAB, S; AMORUSOC, A; PRISCOC DE, A; PANE, M. New insights in enumeration methodologies of probiotic cells in finished products. **Journal of Microbiological Methods**, v.175, 2020.

GARCIA *et al.* The performance of five fruit-derived and freeze-dried potentially probiotic *Lactobacillus* strains in apple, orange and grape juices, **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 98, p. 5000-5010, 2018.

GEBCZYŃSKI *et al.* Effect of storage on the content of selected antioxidants and quality attributes in convection and freeze-dried pears (*Pyrus communis*). **Italian Journal of Food Science**, v. 29, p. 454-460 2017.

GUERGOLETTO *et al.* Dried probiotics for use in functional food applications. In: GUERGOLETTO, K. **Food industrial processes – methods and equipment**. Benjamin Valdez, 2010, v. 1, p. 228-250.

GEORGIEVA *et al.* Technological properties of candidate probiotic *Lactobacillus plantarum* strains. **International Dairy Journal**, v. 19, p. 696-702, 2009.

HAMEED *et al.* Amino Acids, Solubility, Bulk Density and Water Holding Capacity of Novel Freeze-Dried Cow's Skimmed Milk Fermented with potential probiotic *Lactobacillus plantarum* Bu-Eg5 and *Lactobacillus rhamnosus* Bu-Eg6. **Arabian Journal oh Chemistry**, v. 14, p. 1-8, 2021.

HANSEN *et al.* Implications of Modifying Membrane Fatty Acid Composition on Membrane Oxidation, Integrity, and Storage Viability of Freeze-Dried Probiotic, *Lactobacillus acidophilus* La-5. **Biotechnology Progress**, v. 31 (3), 799-807, 2015.

HATHI *et al.* Methodological advances and challenges in probiotic bacteria production: Ongoing strategies and future perspectives. **Biochemical Engineering Journal**, v.176, 1-13, 2021.

HILACHUK, D. *et al.* Patenting activity on functional foods: a Brazilian scenario. **Journal Technology Management Innovation**, v. 16, n. 2, p. 70-81, 2020.

HORÁCKOVÁ, S; ROKYTOVÁ, K; BIALASOVÁ, K; KLOJDOVÁ, I; SLUKOVÁ, M. Fruit juices with probiotics – new type of functional foods. **Food Microbiology and Safety**, 36(4), 284-288, 2018.

IAL – INSTITUTO ADOLFO LUTZ. Métodos físico-químicos para análise de alimentos. Coordenadores Odair Zenebon, Neus Sadocco Pascuet e Paulo Tiglea. 4. ed. São Paulo: Instituto Adolfo Lutz, 2008. 1020 p.

JAGANNATH *et al.* Comparative evaluation of bacterial cellulose (nata) as a cryoprotectant and carrier support during the freeze-drying process of probiotic lactic acid bacteria. **Food Science and Technology – LWT**, v.43, p. 1197-1203, 2010.

JOFRÉ *et al.* Impact of different cryoprotectants on the survival of freeze-dried *Lactobacillus rhamnosus* and *Lactobacillus casei/paracasei* during long- term storage. **Beneficial Microbes**, v.6, p. 381-386, 2015.

JOUKI *et al.* Production of symbiotic freeze-dried yoghurt powder using microencapsulation and cryopreservation of *L. plantarum* in alginate – skim milk microcapsules. **International Dairy Journal**, v. 122, p. 1-9, 2021.

JR, Tagg; AS, Dajani; LW, Wannamaker. Bacteriocins of gram-positive bacteria. **Bacteriology Reviews**, v. 40. P. 722-756, 1976.

JUSTINO *et al.* Peel of araticum fruit (*Annona crassiflora* Mart.) as a source of antioxidant compounds with α -amylase, α -glucosidase and glycation inhibitory activities. **Bioorganic Chemistry**, v. 69, p. 167-182, 2016.

KLEIN *et al.* Taxonomy and physiology of probiotic lactic acid bacteria. **International Journal of Food Microbiology**, 41, 103-125, 1998.

KHANEGHAH *et al.* Interactions between probiotics and pathogenic microorganisms in hosts and foods: A review. **Trends in Food Science & Technology**, v. 95, p. 205-218, 2020.

KOTHARIA *et al.* Probiotic supplements might not be universally effective and safe: A review. **Biomedicine and Pharmacotherapy**, v.111, p. 537-547, 2019.

KURT *et al.* The production and delivery of probiotics: A review of a practical approach. **Microorganisms**, 83 (7), 2-17, 2019.

KURTMANN *et al.* Browning of freeze-dried probiotic bacteria cultures in relation to loss of viability during storage. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 57 (15), p. 6736-6741, 2009.

LANCONELLI *et al.* Drying process strongly affects probiotics viability and functionalities. **Journal of Biotechnology**, v. 214, p. 17–26, 2015.

LASCANO *et al.* Physico-chemical properties, probiotic stability and sensory characteristics of *Lactobacillus plantarum* S20 – supplemented passion fruit (*Passiflora edulis* f. *flavicarpa* Deg.) juice powder. **Food Research**, v. 4 (2), p. 320 – 326, 2020.

LARRAURI, J.A.; RUPÉREZ, P., & SAURA-CALIXTO, F. Effect of drying temperature on the stability of polyphenols and antioxidant activity of red grape pomace peels. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 45(4), p.1390–1393, 1997.

LEACH, *et al.* The influence of rehydration on the viability of dried microorganisms. **Journal of General Microbiology** v. 21, 295-307, 1959.

LEANDRO, DOS SANTOS.E; GINANI, C.V; ALENCAR, R.E; PEREIRA, G.O; PAES, C. Isolation, identification, and screening of lactic acid bacteria with probiotic potential in silage of different species of forage plants, cocoa beans and artisanal salami. **Foods**, 2021.

LEROY & DE VUYST. Lactic acid bacteria as functional starter cultures for the food fermentation industry. **Food Science and Technology**, v.15, p. 67-78, 2004

LI-ZHEN DENG *et al.* Effects of various storage conditions on total phenolic, carotenoids, antioxidant capacity, and color of dried apricots. **Food Control**, v. 136, p. 1-10, 2022.

LIU *et al.* New perspectives of *Lactobacillus plantarum* as a probiotic: The gut-heart-brain axis. **Journal of Microbiology**, v.56, n 9, p 601-613, 2018.

MA *et al.* Effects of environmental stresses on the physiological characteristics, adhesion ability and pathogen adhesion inhibition of *Lactobacillus plantarum* KLDS 1.0328. **Process Biochemistry**, v.92 p. 426-436, 2020.

MAK *et al.* Galangin's potential as a functional food ingredient. **Journal of Functional Foods**, v. 46, p. 490-503, 2018.

MARÍA *et al.* Effect of two preservation methods on the viability and enzyme production of a recombinant *Komagataella phaffii* (*Pichia pastoris*) strain. **Cryobiology**, 2021.

MARNPNAE *et al.* Probiotic Gac fruit beverage fermented with *Lactobacillus paracasei*: Physicochemical properties, phytochemicals, antioxidant activities, functional properties, and volatile flavor compounds. **LWT - Food Science and Technology**, v. 169, 2022.

MAURYA *et al.* Nutraceuticals in their impact on human health. In: MAURYA, A. **Preparation of Phytopharmaceuticals for the management of disorders. The development of nutraceuticals and traditional medicine**. Academic Press, 2021, p. 229-254.

MISRA *et al.* Novel approaches for co-encapsulation of probiotic bacteria with bioactive compounds, their health benefits and functional food product development: A review. **Trends in Food Science & Technology**, v.109, 340-351, 2021.

MOHAMMADY *et al.* Freeze-drying of pharmaceutical and nutraceutical nanoparticles: the effects of formulation and technique parameters on nanoparticles characteristics. **Journal of pharmaceutical sciences**, 1-13, 2020.

MONTEIRO *et al.* Production of probiotic passion fruit (*Passiflora edulis* Sims f. flavicarpa Deg.) Drink Using *Lactobacillus reuteri* and microencapsulation via spray drying. **Foods**, 2020.

MORGAN *et al.* Preservation of microorganisms by drying: A review. **Journal of Microbiological Methods**, v.66, 183-193, 2006.

NOWAK, D., JAKUBCZYK, E. The freeze-drying of food – The characteristic of the process course and the effect of its parameters on the physical properties of food materials. **Foods**, v.9, 2-27, 2020.

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

NUALKAEKUL, S; DEEPIKA, G; CHARALAMPOPOULOS, D. Survival of freeze dried *Lactobacillus plantarum* in instant fruit powders and reconstituted fruit juices. **Food Research International**, 48, 627-633, 2012.

OLIVEIRA *et al.* Dehydrated strawberries for probiotic delivery: Influence of dehydration and probiotic incorporation methods. **LWT**, v. 144, 1-10, 2021.

OLIVEIRA *et al.* Mango and carrot mixed juice: a new matrix for the vehicle of probiotic lactobacilli. **Journal of Food Science and Technology**, 2020.

OLUWATOYIN *et al.* Sucrose, maltodextrin and inulin efficacy as cryoprotectant, preservative and prebiotic – towards a freeze dried *Lactobacillus plantarum* topical probiotic. **Biotechnology Reports**, v. 33, 2022.

OSZMIANSKI, J; WOJDYŁO, A; KOLNIAK, J. Effect of pectinase treatment on extraction of antioxidant phenols from pomace, for the production of puree-enriched cloudy apple juices. **Food Chemistry**, 2011, 623-631.

PIMENTEL *et al.* Application of cassava starch and corn starch biopolymer in guava postharvest conservation. **Brazilian Journal of Development**, v.6 (2), p. 6658-6680, 2020.

PUTNIK *et al.* Functional Foods: Product Development, Technological Trends, Efficacy Testing, and Safety. **Annual Review of Food Science and Technology**, v.1, 3.1-3.26, 2020.

RASCÓN *et al.* Osmotic dehydration assisted impregnation of *Lactobacillus rhamnosus* in banana and effect of water activity on the storage stability of probiotic in the freeze-dried product. **LWT - Food Science and Technology**, v. 92, p. 490-496, 2018.

RAVINDRAN *et al.* Probiotic oats milk drink with microencapsulated *Lactobacillus plantarum* – an alternative to dairy products. **Nutrition & Food Science**, v. 51(3), p. 471-482, 2020.

REPORT. 2023, February. Functional foods ingredients global market report 2023. Disponível em: <https://www.researchandmarkets.com/reports/5744218/functional-food-ingredients-global-market-report#rela4-5733821>. Acessado em 10/08/23.

RIBEIRO *et al.* Development of a probiotic non-fermented blend beverage with juçara fruit: Effect of the matrix on probiotic viability and survival to the gastrointestinal tract. **Food Science and Technology**, v. 118, 1-7, 2020.

ROCKINGER *et al.* Current approaches of preservation of cells during freeze-drying. **Journal of Pharmaceutical Science**, v. 110, p. 2873-2893, 2021.

RODRÍGUEZ, AH; DE LAS RIVAS AB; GÓMEZ-CORDOVÉS, B.; MUÑOZ, R. Characterization of tannase activity in cell-free extracts of *Lactobacillus plantarum* CECT 748T. **International Journal of Food Microbiology**, 121, 92-98, 2008.

RODRÍGUEZ, L.; GASGA, V.; PESCUA, M.; VAN NIEUWENHOVE, C.; MOZZI F.; BURGOS J. Fruits and fruit by-products as sources of bioactive compounds. Benefits and trends of lactic acid fermentation in the development of novel fruit-based functional beverages. **Food Research International**, 2020.

ROESLER *et al.* Evaluation of the antioxidant properties of the brazilian cerrado fruit *Annona crassiflora* Mart. (Araticum). **Journal of Food Science**, v. 71 (2), 2006.

ROMYASAMIT *et al.* Optimization of lyoprotectants for freeze-dried potential probiotic *Enterococcus faecalis* and evaluation of its storage stability. *Drying Technology*, v. 40, p. 1-10, 2021.

RUFINO *et al.* Bioactive compounds and antioxidant capacities of 18 non-traditional tropical fruits from Brazil. *Food Chemistry*, v. 121, p. 996-1002, 2010.

SADY *et al.* The suitability of different probiotic strains for the production of fruit-whey beverages. *Acta Scientiarum Polonorum Technologia Alimentaria*, v. 16 (4), p. 421-429, 2017.

SAHINGIL, D.; HAYALOGLU, AA. Enrichment of antioxidant activity, phenolic compounds, volatile composition and sensory properties of yogurt with rosehip (*Rosa canina* L.) fortification. *International Journal of Gastronomy and Food Science*, v. 28, p. 1-13, 2022.

SAVEDBOWORN *et al.* Potential of protein-prebiotic as protective matrices on the storage stability of vacuum-dried probiotic *Lactobacillus casei*. *Food Science and Technology – LWT*, v.131, p. 1-9, 2020.

SETHIYA *et al.*, 2014. The total antioxidant content and radical scavenging investigation on 17 phytochemical from dietary plant sources used globally as functional food. *Biomedicine & Preventive Nutrition*, v.4, p. 439-444, 2014.

SERTOVIĆ, E.; SARIĆ, Z.; BARAĆ, M.; BARUKČIĆ, I.; KOSTIĆ, A., & BOZANIĆ, R. Physical, chemical, microbiological and sensory characteristics of a probiotic beverage produced from different mixture of cow's milk and soy beverage by *Lactobacillus acidophilus* La5 and yogurt culture. *Food Technology and Biotechnology*, v. 57(4), p. 461-471, 2019.

SILVA *et al.* 2017. Characterization of chemical and mineral composition of marolo (*Annona crassiflora* Mart.) during physiological development. *Food Science and Technology*, v. 37(1), p. 13-18, 2017.

SORNSEEN *et al.* Characterization of probiotic properties and development of banana powder enriched with freeze-dried *Lacticaseibacillus paracasei* probiotics. *Heliyon*, v.8, p. 1-10, 2022.

SOUZA *et al.* Potential interactions among phenolic compounds and probiotics for mutual boosting of their health promoting properties and food functionalities – A review. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, v. p. 1-15, 2018.

SUCCI *et al.* Survival of commercial probiotic strains in dark chocolate with high cocoa and phenols content during the storage and in a static in vitro digestion model. *Journal of Functional Foods*, v. 35, p. 60-67, 2017.

STAVROPOULOU, E & BEZIRTZOGLU, E. Probiotics in Medicine: a long debate. *Frontiers in Immunology*, v.11, p.1-20, 2020.

SZUTOWSKA, Julia; GWIAZDOWSKA, Daniela. Probiotic potential of lactic acid bacteria obtained from fermented curly kale juice. *Archives of Microbiology*, v. 203, p.975-988, 2021.

SZUTOWSKA, Julia. Functional properties of lactic acid bacteria in fermented fruit and vegetable juices: A systematic literature review. **European Food Research and Technology**, v. 246, p.357-372, 2020.

TAGG *et al.* Bacteriocins of gram-positive bacteria. **Bacteriology Reviews**, v. 40 (3), p. 722-756, 1976.

TAYO, BA; AKPEJI, S. Probiotic viability, physicochemical and sensory properties of probiotic pineapple juice. **Fermentation**, v. 2(4), p.2- 20, 2016.

TOLEDO *et al.* Caracterização da superfície de partículas de produtos lácteos desidratados. **Revista Instituto de Laticínios Cândido Tostes**, v. 75, n. 1, p. 10-21, 2020.

TRIGUEROS *et al.* Antioxidant activity and protein-polyphenol interactions in a pomegranate (*Punica granatum* L.) yogurt. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 62, p. 6417-6425, 2014.

U.S. Food and Drug Administration. FDA Issues Draft Guidance on the Labeling of Dietary Supplements Containing Live Microbials de 06/09/2018. Disponível em: <https://www.fda.gov/food/cfsan-constituent-updates/fda-issues-draft-guidance-labeling-dietary-supplements-containing-live-microbials>. Acessado em 14/01/23.

U.S. Food and Drug Administration. FDA. Microorganismos Microbial-Derived Ingredients use in food (partial list) de 01/04/2018. Disponível em: <https://www.fda.gov/food/generally-recognized-safe-gras/microorganisms-microbial-derived-ingredients-used-food-partial-list>. Acessado em 15/12/2022.

U.S. Food and Drug Administration. GRAS Notice (GRN) No. 946 de 01/06/2020. Disponível em <https://www.fda.gov/food/generally-recognized-safe-gras/gras-notice-inventory>. Acessado em 12/01/2023.

VELLY *et al.* Cyclopropanation of unsaturated fatty acids and membrane rigidification improve the freeze-drying resistance of *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* TOMSC161. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 99, p. 970-918, 2015.

VINDEROLA, G., OUWEHAND, A., SALMINEN, S., & VON WRIGHT, A. Lactic Acid Bacteria: Microbiological and Functional Aspects. 5th edition. Boca Raton: CRC Press, 2019

WANG, *et al.* Characteristics of probiotic preparations and their applications. **Foods**, v. 11(16), 2022.

WANG, *et al.* Polysaccharides can improve the survival of *Lactiplantibacillus plantarum* subjected to freeze-drying. **Journal of Dairy Science**, v. 104 (3), p.2606-2614, 2021.

WANG, *et al.* Optimal combination of multiple cryoprotectants and freezing-thawing conditions for high *Lactobacilli* survival rate during freezing and frozen storage. **LWT – Food Science and Technology**, v.99, p. 217-223, 2019.

YE, Q., GEORGES, N., SELOMULYA, C. Microencapsulation of active ingredients in functional foods: from research stage to commercial food products. **Trends in Food Science & Technology**, v. 78, p. 167-179, 2018.

ZAYED & ROSS. Influence of trehalose and moisture content on survival of *Lactobacillus salivarius* subjected to freeze-drying and storage. **Process Biochemistry**, v. 39, p. 1081-1086, 2004.

ZAHID *et al.* Functional and healthy yogurts fortified with probiotics and fruit peel powders. **Fermentation**, v. 8, p.1-16, 2022.

ZHANG *et al.* Storage stability and in vitro digestion of microencapsulated powder containing fermented noni juice and probiotics. **Food Bioscience**, v. 37, p. 1-10, 2020.

ZHENG *et al.* The mechanisms of the protective effects of reconstituted skim milk during convective droplet drying of lactic acid bacteria. **Food Research International**, v.76, p. 478-488, 2015.