

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

CLARISSA LEITE DANTAS

BEBIDA DE SUCO DE ABACAXI E EXTRATO DE GRÃO-DE-BICO
SUPLEMENTADA COM *Lactobacillus paracasei* subsp *paracasei* LBC 81:
CARACTERIZAÇÃO MICROBIOLÓGICA E FÍSICO-QUÍMICA

BRASÍLIA

2023

CLARISSA LEITE DANTAS

BEBIDA DE SUCO DE ABACAXI E EXTRATO DE GRÃO-DE-BICO
SUPLEMENTADA COM *Lactobacillus paracasei* subsp *paracasei* LBC 81:
CARACTERIZAÇÃO MICROBIOLÓGICA E FÍSICO-QUÍMICA

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. Raquel Braz Assunção Botelho

BRASÍLIA

2023

CLARISSA LEITE DANTAS

BEBIDA DE SUCO DE ABACAXI E EXTRATO DE GRÃO-DE-BICO
SUPLEMENTADA COM *Lactobacillus paracasei* subsp *paracasei* LBC 81:
CARACTERIZAÇÃO MICROBIOLÓGICA E FÍSICO-QUÍMICA

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 por:

MEMBROS DA BANCA

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

Profa. Dra. Sandra Fernandes Arruda
(Membro Interno – Universidade de Brasília)

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

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

BRASÍLIA

2023

Clarissa Leite Dantas

Bebida de suco de abacaxi e extrato de grão-de-bico suplementada com *Lactobacillus paracasei* subsp *paracasei* LBC 81: caracterização microbiológica e físico-química/Clarissa Leite Dantas

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. Raquel Braz de Assunção Botelho

1. Bactéria láctica 2. Probiótico 3. Bebida vegetal 4. Abacaxi 5. Grão-de-bico 6. *Lactobacillus paracasei* subsp *paracasei* LBC 81

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, ao meu bom Deus, pela força e entusiasmo para permanecer firme até o final desta árdua e feliz jornada acadêmica. Pelos recursos, oportunidades e encontros tão especiais e necessários que tive nesta universidade.

À Nossa Senhora, por sua doce e amorosa presença em meus dias; pelo conforto que sempre encontrei em seu colo de mãe.

Aos meus pais, por sempre me incentivarem no caminho do bem e do sacrifício fecundo dos estudos.

À minha mãe, por ser a minha fortaleza diária, encorajar-me com sua força e resiliência. Por nunca perder o ânimo mesmo diante de tantos desafios que a vida nos trouxe. Por todo sacrifício e amor que me sustentaram até aqui. Por ter sempre uma palavra de esperança. E por permanecer comigo sempre.

À minha orientadora, professora Eliana, por se colocar sempre disponível e acessível em sua função de orientar; por se preocupar com meu desempenho sem medir esforços para garantir que eu estivesse em total condição de realizar a pesquisa. Por acreditar em mim e ser tão paciente, humana e sensível às minhas dificuldades, sempre respeitando meu limite e conduzindo a pesquisa com leveza e assertividade. S

Ao professor Márcio Mendonça, por oferecer o espaço do laboratório de Agronomia, seu tempo e generoso auxílio nas análises de composição de centesimal.

Às minhas parceiras de pesquisa Carla, Luiza e Maria Carolina, por todo o carinho, acolhimento e respeito no trabalho conjunto. Por sempre se colocarem à disposição para me ajudar. Pelas discussões de pesquisa valiosas que tivemos. E pela amizade que formamos. À minha parceira de pesquisa Maria Carolina, por sua dedicação e amor ao que faz. Por seu compromisso e generoso auxílio nos experimentos e análises.

À minha coorientadora, professora Raquel, por participar da tomada de decisões importantes para o rumo da pesquisa e oferecer suporte à condução do experimento.

Aos técnicos dos laboratórios de Bioquímica da Nutrição, Higiene dos Alimentos e Análise de Alimentos da Faculdade de Agronomia.

À Universidade de Brasília (UnB) e ao Programa de Pós-Graduação em Nutrição Humana (PPGNH), pela oportunidade de realização do mestrado.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e à Fundação de Amparo à Pesquisa do Distrito Federal (FAPDF), pelo fomento à pesquisa.

“O Senhor é o meu pastor: nada me faltará. O Senhor renova as minhas forças e me guia por caminhos certos. Ainda que eu ande por um vale escuro, não terei medo de nada. Pois Tu, ó Senhor Deus, estás comigo. Certamente, a Tua bondade e o Teu amor ficarão comigo enquanto eu viver.”

Salmo 23

“Confie no Senhor de todo o coração e não se apoie na sua própria inteligência. Lembre de Deus em tudo o que fizer, e Ele lhe mostrará o caminho certo.”

Provérbios 3:5-6

“Dai-me, Senhor, a perseverança das ondas do mar, que fazem de cada recuo um ponto de partida para um novo avançar.”

Cecília Meireles

RESUMO

Introdução: No Brasil, sucos de frutas são algumas das bebidas não alcoólicas mais consumidas. Atualmente, pesquisas têm sido realizadas com o desenvolvimento de sucos de frutas fermentados ou suplementados com BALs probióticas como culturas iniciadoras. Contudo, a aplicação de culturas probióticas em sucos de frutas representa um desafio, em razão de características próprias da estirpe e do meio de cultura que podem comprometer seu crescimento e viabilidade. O abacaxi contém nutrientes essenciais ao crescimento e manutenção da sobrevivência de BALs, como frutose, glicose e minerais, e vários estudos têm demonstrado que o suco de abacaxi pode ser um meio adequado para o cultivo de diversas estirpes, sobretudo quando suplementado com outros componentes capazes de acentuar sua estabilidade, como prebióticos, soro de leite e outros. Sucos de frutas são bebidas pobres em aminoácidos livres e peptídeos, enquanto o grão-de-bico contém proteínas que possuem em sua composição todos os aminoácidos, inclusive em sua forma livre. **Objetivo:** Caracterizar os parâmetros físico-químicos e microbiológicos de uma bebida probiótica elaborada com suco de abacaxi e extrato de grão-de-bico. **Materiais e métodos:** Foram desenvolvidas as seguintes formulações: F1: suco de abacaxi (100%); F2: suco de abacaxi (90%) + extrato de grão-de-bico (10%); e F3: suco de abacaxi (80%) + extrato de grão-de-bico (20%). Estas formulações foram suplementadas com concentrado de células de *L. paracasei*. As bebidas foram avaliadas quanto à composição centesimal, sem adição da cultura, e avaliadas antes e com 7, 14, 21 e 28 dias de armazenamento a 4 °C com relação às variáveis químicas (pH, acidez titulável e sólidos solúveis) e microbiológicas (viabilidade de *L. paracasei* e bolores e leveduras). **Resultados e discussões:** A adição do extrato de grão-de-bico às bebidas aumentou significativamente ($p < 0,05$) o teor de proteínas. A viabilidade de *L. paracasei* foi significativamente ($p < 0,05$) maior na formulação da bebida que continha maior percentual de extrato de grão-de-bico (F3). Todas as bebidas apresentaram decréscimo de pH e sólidos solúveis no decorrer de 28 dias de armazenamento. Também se observou que em todas as bebidas houve aumento da acidez titulável durante 28 dias de armazenamento. A viabilidade de *L. paracasei* foi significativamente maior ($p < 0,05$) na formulação F3 com extrato de grão-de-bico após exposição sequencial aos sucos gástrico e intestinal. Portanto, a adição de grão-de-bico ao suco de abacaxi aumentou a estabilidade de *L. paracasei* durante o armazenamento e promoveu um efeito protetor ao *L. paracasei* na exposição sequencial aos sucos gástrico e intestinal. Esses efeitos parecem estar relacionados ao aumento do teor de proteínas da bebida promovido pela adição do extrato de grão-de-bico.

Palavras-chave: *L. paracasei*; Viabilidade; Probiótico; Suco de abacaxi; Extrato de grão-de-bico.

ABSTRACT

Introduction: Fruit juices are one of the most consumed non-alcoholic beverages in Brazil. Currently, research has been carried out on developing fermented fruit juices or supplemented with probiotic LABs as starter cultures. However, applying the probiotic culture to fruit juices represents a challenge given the strain-specific and substrate characteristics that might compromise its growth and viability. Pineapple contains essential nutrients for the LABs growth and survival stability, such as fructose, glucose, and minerals, and several studies have shown that pineapple juice might be a suitable vehicle for different strains, mostly when supplemented with alternatives capable of enhancing its stability, such as prebiotics, whey from milk curds, and others. Fruit juices are not rich in free amino acids and peptides. On the other hand, adding chickpea extract can be a strategy to supply or compensate for the lack of proteins since chickpea contains proteins and amino acids, including these last ones in their free form. **Objective:** To characterize the physical-chemical and microbiological parameters of a probiotic beverage made with pineapple juice and chickpea extract. **Materials and methods:** The following formulations were developed: F1: pineapple juice (100%); F2: pineapple juice (90%) + chickpea extract (10%); and F3: pineapple juice (80%) + chickpea extract (20%). These formulations were supplemented with a concentrate of *L. paracasei* cells. The beverages were evaluated for their centesimal composition, with no addition of culture, and evaluated before and after 7, 14, 21, and 28 days of storage at 4 °C regarding chemical (pH, titratable acidity, and soluble solids) and microbiological variables (viability of *L. paracasei* and molds and yeasts). **Results and discussion:** The beverage preparation with chickpea extract significantly ($p < 0,05$) increased the protein content. The *L. paracasei* viability was significantly ($p < 0,05$) higher in the beverage formulation that contained the highest percentage of chickpea extract (F3). All beverages showed decreased pH and soluble solids over 28 days of storage. It was also observed that in all beverages, there was an increase in titratable acidity during the 28 days of storage. The *L. paracasei* viability was significantly ($p < 0,05$) higher in the formulation with chickpea extract (F3) after sequential exposure to gastric and intestinal juices. Thus, the addition of chickpea extract to the pineapple juice enhanced *L. paracasei* stability during storage and showed a protective effect to *L. paracasei* in the sequential exposure to the gastric and intestinal juices. These effects seem to be related to the increase in the protein content of the beverage promoted by adding chickpea extract.

Keywords: *L. paracasei*; Viability; Probiotic; Pineapple juice; Chickpea extract.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1** Variação de pH, acidez titulável (g/100 g de ácido) e sólidos solúveis totais (°BRIX) em bebidas de suco de abacaxi e extrato de grão-de-bico suplementadas com concentrado de células de *Lactobacillus paracasei* subsp *paracasei* LBC 81 durante um período de estocagem de 28 dias a 4 °C..... 45
- Figura 2** Sinérese de bebidas de suco de abacaxi e extrato de grão-de-bico suplementadas com concentrado de *Lactobacillus paracasei* subsp *paracasei* LBC 81 independente do tempo de estocagem..... 50
- Figura 3** Viabilidade de *Lactobacillus paracasei* subsp *paracasei* LBC 81 em formulações de bebida de suco de abacaxi e extrato de grão-de-bico independente do tempo de armazenamento e durante estocagem de 28 dias a 4° C..... 51
- Figura 4** Viabilidade de *Lactobacillus paracasei* subsp *paracasei* LBC 81 adicionada às bebidas de suco de abacaxi e extrato de grão-de-bico após exposição a condições do trato gastrointestinal *in vitro*..... 56

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Composição centesimal das formulações de bebida de suco de abacaxi e extrato de grão-de-bico antes de pasteurização e adição de concentrado de células de *L. paracasei* subsp *paracasei* LBC

81..... 43

Tabela 2. Equações de regressão e valor r^2 de diferentes parâmetros (acidez titulável, pH, viabilidade e sólidos solúveis) de bebidas de suco de abacaxi e extrato de grão-de-bico durante 28 dias de armazenamento a 4

°C..... 47

Tabela 3 – Equações de regressão e valor r^2 de diferentes parâmetros (acidez titulável, pH, viabilidade e sólidos solúveis) de bebidas de suco de abacaxi e extrato de grão-de-bico durante 28 dias de armazenamento a 4 °C..... 52

LISTA DE ABREVIACOES

ANVISA - Agência Nacional de Vigilância Sanitária

AT – Acidez titulável

ATP – Adenosina trifosfato

BAL - Bactéria láctica

FOS – Fruto-oligossacarídeos

ID – Intestino delgado

LAB – Lactic acid bacteria

SCSS - Suspensão de células em soluço salina

SST – Sólidos solúveis totais

TGI - Trato gastrointestinal

UFC - Unidades Formadoras de Colnias

SUMÁRIO

RESUMO.....	8
ABSTRACT	9
LISTA DE FIGURAS.....	10
LISTA DE TABELAS	11
LISTA DE ABREVIACÕES	12
1. INTRODUÇÃO	17
2. OBJETIVOS.....	19
2.1. OBJETIVO GERAL.....	19
2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	19
3. REFERENCIAL TEÓRICO.....	20
3.1. BACTÉRIAS LÁCTICAS.....	20
3.2. PROBIÓTICOS.....	21
3.3. SUCO DE FRUTAPROBIÓTICO.....	23
3.3.1. ABACAXI E SUCO DE ABACAXI.....	23
3.3.2. CRESCIMENTO E SOBREVIVÊNCIA DE BACTÉRIAS PROBIÓTICAS EM SUCO DE FRUTA.....	24
3.3.3. SOBREVIVÊNCIA DE PROBIÓTICOS EM SUCOS GASTRO INTESTINAIS SIMULADOS <i>in vitro</i>	25
3.3.4. ALTERNATIVAS PARA ACENTUAR A SOBREVIVÊNCIA DE PROBIÓTICOS EM SUCOS DE FRUTAS.....	27
3.4. GRÃO-DE-BICO.....	29
4. METODOLOGIA.....	32
4.1. TIPO DE ESTUDO.....	32
4.2. ELABORAÇÃO DO SUCO DE ABACAXI E DO EXTRATO DE GRÃO-DE-BICO.....	32
4.2.1. ELABORAÇÃO DO EXTRATO VEGETAL DE GRÃO-DE-BICO.....	32
4.2.2. ELABORAÇÃO DO SUCO DE ABACAXI.....	32
4.2.3. ELABORAÇÃO DE DIFERENTES FORMULAÇÕES DA BEBIDA VEGETAL À BASE DE SUCO DE ABACAXI E EXTRATO DE GRÃO.....	32

4.3. CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA DAS FORMULAÇÕES DE BEBIDA À BASE DE SUCO DE ABACAXI E EXTRATO DE GRÃO-DE-BICO.....	34
4.3.1. pH.....	34
4.3.2. ACIDEZ TITULÁVEL.....	34
4.3.3. SÓLIDOS SOLÚVEIS TOTAIS.....	35
4.3.4. UMIDADE.....	35
4.3.5. RESÍDUO MINERAL.....	35
4.3.6. PROTEÍNA.....	36
4.3.7. LIPÍDEO.....	37
4.3.8. CARBOIDRATO E VALOR CALÓRICO.....	38
4.3.9. FIBRA BRUTA.....	38
4.4. ELABORAÇÃO DA BEBIDA ADICIONADA DE PROBIÓTICO.....	39
4.4.1. OBTENÇÃO DA CULTURA ESTOQUE DE <i>L. paracasei</i> LBC 81.....	39
4.4.2. OBTENÇÃO DO CONCENTRADO DE CÉLULAS PARA ADIÇÃO NAS DIFERENTES FORMULAÇÕES.....	39
4.4.3. ANÁLISE DAS BEBIDAS ADICIONADAS DO CONCENTRADO DE CÉLULAS.....	40
4.4.3.1. ANÁLISE MICROBIOLÓGICA.....	40
4.4.3.1.1. DETERMINAÇÃO DA VIABILIDADE DE <i>L. paracasei</i> LBC 81.....	40
4.4.3.1.2. DETERMINAÇÃO DE BOLORES E LEVEDURAS.....	40
4.4.3.2. ANÁLISE FÍSICO-QUÍMICA.....	41
4.4.3.2.1 DETERMINAÇÃO DE SINÉRESE.....	41
4.5. DETERMINAÇÃO DA SOBREVIVÊNCIA DE <i>L. paracasei</i> LBC 81 EM SUCOS GASTROINTESTINAIS SIMULADOS <i>in vitro</i>	41
4.6. ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	43
RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	43
5.1. COMPOSIÇÃO QUÍMICA DAS DIFERENTES FORMULAÇÕES DE BEBIDA DE SUCO DE ABACAXI E EXTRATO DE GRÃO-DE-BICO.....	43
5.2. CARACTERIZAÇÃO DAS DIFERENTES FORMULAÇÕES DE BEBIDA DE SUCO DE ABACAXI E EXTRATO DE GRÃO-DE-BICO DURANTE ARMAZENAMENTO REFRIGERADO.....	45
5.2.1. pH.....	48
5.2.2. ACIDEZ TITULÁVEL.....	49
5.2.3. SÓLIDOS SOLÚVEIS TOTAIS.....	49

5.3. BOLORES E LEVEDURAS.....	50
5.4. SINÉRESE.....	50
5.5. VIABILIDADE DE <i>Lactobacillus paracasei</i> subsp <i>paracasei</i> LBC 81 DURANTE ESTOCAGEM DE 28 DIAS A 4 °C.....	52
5.6. VIABILIDADE DE <i>Lactobacillus paracasei</i> subsp <i>paracasei</i> LBC 81 APÓS EXPOSIÇÃO AOS SUCOS GÁSTRICO E INTESTINAL.....	57
6. CONCLUSÃO.....	62
7. REFERÊNCIAS.....	63

1. INTRODUÇÃO

A crescente busca por uma alimentação mais saudável tem impulsionado o desenvolvimento de novos alimentos com propriedades funcionais, principalmente fontes de compostos bioativos e contendo probióticos (MARRERO *et al.*, 2019). Os probióticos são micro-organismos que, quando ingeridos em quantidades adequadas, conferem benefícios ao hospedeiro (HILL *et al.*, 2014). Esses micro-organismos têm sido associados a vários efeitos benéficos, principalmente relacionados com a saúde gastrointestinal (FLOCH, 2018).

Durante décadas, o mercado de probióticos teve o foco em produtos lácteos (iogurte e outros produtos fermentados), porém o aumento do consumo de produtos não lácteos devido ao veganismo, intolerância à lactose e hipercolesterolemia exigiu mudanças nesse cenário (PIMENTEL *et al.*, 2021). Assim, matrizes vegetais, como os sucos de frutas, têm sido sugeridas como potenciais veículos probióticos (WU *et al.*, 2021; MONTEIRO *et al.*, 2020; RIBEIRO *et al.*, 2019). No entanto, vários fatores intrínsecos às frutas podem comprometer a viabilidade, como pH ácido (em torno de 2,5 e 4,0), baixa concentração de alguns nutrientes, presença de compostos fenólicos com propriedades antimicrobianas, assim como a capacidade da estirpe de se adaptar ao meio (ANTUNES *et al.*, 2013; CHAMPAGNE; GARDER, 2008; SAARELA *et al.*, 2006; SAARELA *et al.*, 2011).

O abacaxi, apesar de seu caráter ácido, contém nutrientes essenciais ao crescimento e manutenção da sobrevivência de bactérias lácticas (BALs): frutose, glicose (CHEN; PAULL, 2000; ZHANG *et al.*, 2006) e minerais (potássio, principalmente) (ZHANG *et al.*, 2007; ANSES, 2020). Os estudos com bebidas elaboradas com suco de abacaxi, em sua maioria fermentadas, demonstraram que essa fruta é uma matriz viável para o crescimento e estabilidade de sobrevivência de diversas estirpes probióticas durante a estocagem e após o estresse das fases da digestão (COSTA *et al.*, 2013; CAMPOS *et al.*, 2019; NGUYEN *et al.*, 2019; ISLAM *et al.*, 2021).

O abacaxi, como as demais frutas, é considerado um alimento pobre em proteínas (BATES; MORRIS; CRANDALL, 2001). A suplementação de sucos de frutas com fontes vegetais ricas em proteínas é uma alternativa de enriquecimento proteico dos sucos. No grão-de-bico, por exemplo, as proteínas são o segundo nutriente em maior quantidade (21 a 25 %) (RACHWA-ROSIK; NEBESNY; BUDRYN, 2015) e onde se concentram todos os aminoácidos, essenciais e não essenciais (WANG *et al.*, 2010; KOU *et al.*, 2013). Além disso, essa leguminosa possui oligossacarídeos prebióticos (MARTINEZ-

VILLALUENGA *et al.*, 2006) e compostos fenólicos (AROOJ *et al.*, 2021), fundamentais à sobrevivência das BALs em condições hostis (SIDHU *et al.*, 2020). Estudos com bebidas à base de grão-de-bico têm demonstrado sua aptidão como carreadora de estirpes probióticas (SKRZYPCZAK *et al.*, 2019; MESQUITA *et al.*, 2020; LOPES *et al.*, 2020; HUSSEIN *et al.*, 2020).

A estirpe *Lactobacillus paracasei* subsp *paracasei* LBC 81 é uma cultura comercial, e sua sobrevivência já foi avaliada em produtos lácteos, como leite fermentado (VOGADO *et al.*, 2018; VOGADO *et al.*, 2019) e queijo tipo cottage (MEDEIROS *et al.*, 2020), e em produtos não lácteos, como bebida à base de milho (MENEZES *et al.*, 2018), em sucos de frutas (maracujá) (FONSECA, 2022) e em extrato aquoso de grão-de-bico (MESQUITA *et al.*, 2020 e MESQUITA *et al.*, 2021). Entretanto, a sobrevivência de *L. paracasei* LBC 81 ainda não foi avaliada em suco de abacaxi.

Considerando-se que o grão-de-bico é uma fonte de oligossacarídeos e fibras com função prebiótica, compostos fenólicos e aminoácidos na forma livre, a exemplo da arginina (MARTINEZ-VILLALUENGA *et al.*, 2006; AROOJ *et al.*, 2021; CORTÉS-GIRALDO *et al.*, 2016), e que os aminoácidos livres são utilizados em mecanismo de defesa às condições de estresse ácido por algumas bactérias lácticas (WANG; CUI; QU, 2018), a nossa hipótese é que a adição de extrato de grão-de-bico no suco de abacaxi poderá acentuar a sobrevivência de *L. paracasei* LBC 81 durante o armazenamento da bebida e, também, quando exposto às condições simuladas gastrointestinais *in vitro*.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo Geral

Desenvolver uma bebida de suco de abacaxi e extrato de grão-de-bico probiótica.

2.2. Objetivos Específicos

- Avaliar o efeito do extrato de grão-de-bico quando adicionado ao suco de abacaxi no crescimento e sobrevivência da estirpe *L. paracasei* LBC 81 durante o período de armazenamento refrigerado;
- Avaliar o crescimento e sobrevivência da estirpe *L. paracasei* LBC 81 em uma bebida à base de suco de abacaxi adicionado de extrato de grão-de-bico.
- Verificar o efeito do extrato de grão-de-bico em suco de abacaxi na sobrevivência de *L. paracasei* LBC 81 após exposição a sucos gastrointestinais simulados *in vitro*;
- Avaliar o efeito do extrato de grão-de-bico quando adicionado ao suco de abacaxi nos parâmetros físico-químicos.

3. REFERENCIAL TEÓRICO

3.1. BACTÉRIAS LÁCTICAS

As bactérias lácticas (BALs) são um dos grupos de bactérias mais importantes na indústria de alimentos (REUBEN *et al.*, 2020). As BALs pertencem a um grupo heterogêneo constituído por cocos gram-positivos, catalase-negativa, não formadores de esporos (exceto *Sporolactobacillus* spp.) ou bastonetes. Apresentam capacidade de produzir ácido láctico como principal produto final gerado pela fermentação de carboidratos (AXELSSON, 2004). Com base nos produtos finais da fermentação, as BALs podem ser classificadas como bactérias homofermentativas obrigatórias, que produzem principalmente o ácido láctico (cerca de 90 %), ou bactérias heterofermentativas obrigatórias, que produzem vários metabólitos, incluindo ácido láctico, ácido acético, etanol e dióxido de carbono. Algumas espécies são classificadas como heterofermentativas facultativas, capazes de realizar ambas as vias de fermentação (HUTKINS, 2018).

As BALs são encontradas em diferentes nichos ecológicos, tais como plantas, insetos, solo, água e leite, bem como nos tratos gastrointestinal (TGI), respiratório e vaginal de humanos e animais (GEORGE *et al.*, 2018). Tais bactérias são conhecidas por seus papéis essenciais na produção de mais de 3500 tipos de alimentos fermentados, bebidas e silagem (ração animal) (TAMANG; WATANABE; HOLZAPFEL, 2016).

Taxonomicamente, as BALs são pertencentes ao filo Firmicutes, que inclui os seguintes gêneros: *Aerococcus*, *Carnobacterium*, *Enterococcus*, *Tetragenococcus*, *Vagococcus*, *Pediococcus*, *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Oenococcus*, *Weissella*, *Lactococcus* e *Streptococcus* (HOLZAPFEL; WOOD, 2014). Recentemente, o gênero *Lactobacillus* foi reclassificado por cientistas em 25 gêneros: *Lactobacillus*, *Paralactobacillus*, *Amylolactobacillus*, *Acetilactobacillus*, *Agrilactobacillus*, *Apilactobacillus*, *Bombilactobacillus*, *Companilactobacillus*, *Dellaglioia*, *Fructilactobacillus*, *Furfurilactobacillus*, *Holzapfelia*, *Lacticaseibacillus*, *Lactiplantibacillus*, *Lapidilactobacillus*, *Latilactobacillus*, *Lentilactobacillus*, *Levilactobacillus*, *Ligilactobacillus*, *Limosilactobacillus*, *Liquorilactobacillus*, *Loigolactobacillus*, *Paucilactobacillus*, *Schleiferilactobacillus* e *Secundilactobacillus* (ZHENG *et al.*, 2020).

Tais espécies pertencentes a esses gêneros são reconhecidas como “Geralmente Consideradas Seguras” (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).

Juntamente com o gênero *Bifidobacterium* (*B. animalis*, *B. longum*, *B. lactis*, *B. bifidum*, *B. infantis*, *B. breve*), espécies de *Lactobacillus* (*L. acidophilus*), *Lacticaseibacillus* (*L. casei*, *L. rhamnosus*), *Lactiplantibacillus* (*L. plantarum*), *Ligilactobacillus* (*L. salivarius*) e *Limosilactobacillus* (*L. fermentum*, *L. reuteri*) são mais comumente usadas como probióticos (PIMENTEL *et al.*, 2021).

3.2. PROBIÓTICOS

De acordo com a definição proposta pela FAO/OMS, probióticos são micro-organismos que, quando administrados em quantidades adequadas, conferem benefícios à saúde do hospedeiro (FAO/OMS, 2002). Diversos efeitos benéficos já foram aceitos para bactérias probióticas, tais como: a) controle e redução de colesterol, b) melhora do sistema imunológico, c) prevenção de infecções intestinais e supressão de diarreia associada a antibióticos, d) redução dos sintomas de intolerância à lactose, e) redução do risco de câncer de cólon e f) melhora na digestão de gliadina de alimentos contendo glúten, nos casos de doença celíaca (GAREAU *et al.*, 2010; OELSCHLAEGGER, 2010).

Os probióticos conferem seus efeitos benéficos à saúde por meio de diferentes mecanismos. Os mecanismos de ação dos probióticos incluem inibição competitiva da multiplicação de bactérias patogênicas por meio da alteração do pH e redução da disponibilidade de oxigênio, criando condições intestinais menos favoráveis (SCHEPPER *et al.*, 2017), inibição não competitiva pela produção de bacteriocinas (LOPETUSO *et al.*, 2019), síntese de vitaminas, aumento da biodisponibilidade de nutrientes (PANDEY *et al.*, 2015) e estimulação do sistema imunológico do hospedeiro (KOBBER; BOWE, 2015). Algumas características são fundamentais para as bactérias probióticas executarem suas funções, como fatores de aderência, proteínas de ligação ao muco, proteínas de ligação à fibronectina, bacteriocinas, fatores de tolerância ao meio ácido e ao estresse, hidrolases de sais biliares e exopolissacarídeos (KLEEREBEZEM *et al.*, 2003; PRIDMORE *et al.*, 2004; ALTERMANN *et al.*, 2005).

Para garantir os efeitos benéficos à saúde do hospedeiro, uma concentração mínima de células probióticas viáveis deve chegar ao intestino. O mínimo da concentração de células bacterianas sugerida é de cerca de 8 log UFC/g ou mL de alimento no tempo de consumo, de modo que as diminuições observadas na sobrevivência

durante a exposição ao TGI não comprometam a funcionalidade dos probióticos no hospedeiro (WGO, 2017). Apesar das diferenças entre as quantidades diárias recomendadas por agências americanas ou europeias para atuais alegações de saúde, foi proposto que a ingestão diária de números em torno de 6-9 log UFC de probiótico/g ou mL é eficaz (GROM *et al.*; 2020; RANADHEERA *et al.*, 2019). No entanto, para alegar efeitos específicos à saúde, a dose do concentrado de probióticos pode ser menor e é específica da estirpe (HILL *et al.*; 2014; WGO, 2017).

No Brasil, o uso de probióticos em alimentos requer avaliação prévia da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) conforme previsto na RDC nº 241/2018, que indica os procedimentos necessários para se solicitar o uso de probióticos em um produto e alegações de saúde relacionadas. Segundo esta resolução, o uso de probióticos em alimentos necessita de comprovação de sua segurança e eficácia. A comprovação de segurança deve ser realizada por meio de estudos que demonstrem histórico de uso seguro, ausência de eventos adversos, ausência de virulência e fatores patogênicos, ausência de produção de substâncias ou metabólitos que causem riscos à saúde do hospedeiro, ausência de resistência a antibióticos e suscetibilidade a pelo menos dois antibióticos (BRASIL, 2018).

Os micro-organismos probióticos quando incorporados em alimentos tornam-se mais suscetíveis a fatores físicos, químicos e biológicos (TERPOU *et al.*, 2019). Vários estudos atualmente têm avaliado a sobrevivência de probióticos em diferentes matrizes vegetais (WU *et al.*, 2021; MONTEIRO *et al.*, 2020; RIBEIRO *et al.*, 2019; GARCIA *et al.*, 2018; NGUYEN *et al.*, 2019; MOKHTARI; JAFARI; KHOMEIRI, 2018; SOARES, 2016; ESPIRITO-SANTO; CARLIN; RENARD, 2015; COSTA *et al.*, 2013; CONCEIÇÃO, 2016; MESQUITA *et al.*, 2020; RAVINDRAN, 2020; BRUNO *et al.*, 2020; SKRZYPCZAK *et al.*, 2019; PIMENTEL *et al.*, 2015; XU *et al.*, 2019; ANEJA *et al.*, 2014; CHAMPAGNE GARDER, 2008; CHAMPAGNE; RAYMOND; GAGNON, 2008; ZHU *et al.*, 2020).

Os sucos de fruta têm sido alvo de investigações quanto à capacidade de crescimento da estirpe e de sua sobrevivência durante o período de armazenamento (WU *et al.*, 2021; MONTEIRO *et al.*, 2020; RIBEIRO *et al.*, 2019; GARCIA *et al.*, 2018; NGUYEN *et al.*, 2019; MOKHTARI; JAFARI; KHOMEIRI, 2018; SOARES, 2016; ESPIRITO-SANTO; CARLIN; RENARD, 2015; COSTA *et al.*, 2013; PIMENTEL *et al.*, 2015; XU *et al.*, 2019; ANEJA *et al.*, 2014; CHAMPAGNE; GARDER, 2008; CHAMPAGNE; RAYMOND; GAGNON, 2008; ZHU *et al.*, 2020).

Uma bebida de juçara, banana e morango suplementada com cultura de *L. plantarum* CNPC003 apresentou viabilidade probiótica acima de 6,0 log UFC/mL em 60 dias de refrigeração a 3,8 °C. Somente após 75 dias, a viabilidade sofreu decréscimo (RIBEIRO *et al.*, 2019). Zhu *et al.* (2020) também observaram que a viabilidade probiótica em bebidas de frutas atendeu ao mínimo recomendado para alimentos probióticos. Sucos de maçã, laranja e tomate com pH inicial entre 3,0 e 4,0 demonstraram potencial como matriz para *L. sanfranciscensis*, que apresentou viabilidade entre 10⁶ e 10⁷ UFC/mL ao final de 4 semanas a 4 °C.

Além disso, também tem sido investigado o efeito protetor dos sucos de frutas na sobrevivência de probióticos quando expostos às condições simuladas do TGI *in vitro* (PHOEM; CHANTHACHUM; VORAVUTHIKUNCHAI, 2015; RIBEIRO *et al.*, 2019; CAMPOS *et al.*, 2019; GARCIA *et al.*, 2018; NGUYEN *et al.*, 2019; ISLAM *et al.*, 2021). No estudo de Ribeiro *et al.* (2019), com bebida de juçara, banana e morango suplementada com estirpe probiótica, a em amostra refrigerada a 3,8 °C por 30 dias, *L. plantarum* CNPC003 demonstrou resistência ao estresse GI simulado. Após exposição ao suco gástrico, a viabilidade *L. plantarum* reduziu de 7,9 a 6,7 log UFC/mL, enquanto na exposição ao suco intestinal, realizada em duas fases, as viabilidades foram 6,6 logs UFC/mL e 6,4 log UFC/mL permanecendo viável em concentração essencial como requisito para alimento probiótico.

3.3. SUCO DE FRUTA PROBIÓTICO

Por muitos anos, o mercado de probióticos se concentrou em produtos lácteos, porém com o crescimento do consumo de produtos de matriz não láctea por indivíduos com intolerância à lactose, hipercolesterolemia e/ou adeptos ao veganismo, têm sido necessárias mudanças neste cenário (NGUYEN *et al.*, 2019).

Assim, as matrizes vegetais têm sido sugeridas como potenciais veículos probióticos (WU *et al.*, 2021; MONTEIRO *et al.*, 2020; RIBEIRO *et al.*, 2019; GARCIA *et al.*, 2018; NGUYEN *et al.*, 2019; MOKHTARI; JAFARI; KHOMEIRI, 2018; SOARES, 2016; ESPIRITO-SANTO; CARLIN; RENARD, 2015; COSTA *et al.*, 2013; PIMENTEL *et al.*, 2015; XU *et al.*, 2019; ANEJA *et al.*, 2014; ZHU *et al.*, 2020; ANTUNES *et al.*, 2013; MESQUITA *et al.*, 2020).

3.3.1. ABACAXI E SUCO DE ABACAXI

O abacaxi (*Ananas comosus* (L.) Merr) é uma fruta amplamente cultivada e consumida em regiões tropicais e subtropicais (DEBNATH *et al.*, 2021). Como outras frutas, o abacaxi é importante na dieta humana (HOUNHOUIGAN *et al.*, 2014). A fruta pode ser consumida *in natura* ou processada em diversas formas, sendo que o suco de abacaxi é de consumo mais popular devido ao seu aroma e sabor agradáveis (RATTANATHANALERK *et al.*, 2005). Compostos fenólicos e carotenoides são fitoquímicos encontrados no suco de abacaxi que produzem benefícios à saúde humana por reduzirem o risco de dano oxidativo relacionado à presença de radicais livres, mas também o risco de desenvolver diferentes tipos de câncer e doenças cardiovasculares e neurológicas (COLLINS; HARRINGTON, 2002).

No suco de abacaxi, são encontradas duas formas de vitamina C, ácido 1-ascórbico e dehidroascórbico. O ácido 1-ascórbico é a principal forma biologicamente ativa da vitamina C. É oxidado reversivelmente para formar ácido dehidroascórbico, que também exibe atividade biológica (LAORKO *et al.*, 2010). O teor total de vitamina C no abacaxi maduro é cerca de 26 mg/100 g de peso fresco (HERNÁNDEZ *et al.*, 2006). No entanto, estudos têm verificado que muitos compostos fitoquímicos são reduzidos durante o tratamento térmico convencional (LAORKO *et al.*, 2010).

Além dos compostos fitoquímicos, assim como outras frutas, o abacaxi é fonte de fibra alimentar, que favorece a permanência de bactérias benéficas, particularmente dos gêneros *Lactobacillus* e *Bifidobacterium*, na microbiota intestinal do hospedeiro (DE VRESE *et al.*, 2008).

Estudos têm demonstrado que os sucos de frutas geralmente favorecem o crescimento de estirpes probióticas, visto que em sua matriz alimentar contém vários nutrientes (WU *et al.*, 2021; MONTEIRO *et al.*, 2020; RIBEIRO *et al.*, 2019; GARCIA *et al.*, 2018; NGUYEN *et al.*, 2019; MOKHTARI; JAFARI; KHOMEIRI, 2018; SOARES, 2016; ESPIRITO-SANTO; CARLIN; RENARD, 2015; COSTA *et al.*, 2013; PIMENTEL *et al.*, 2015; XU *et al.*, 2019; ANEJA *et al.*, 2014; CHAMPAGNE; GARDER, 2008; CHAMPAGNE; RAYMOND; GAGNON, 2008; ZHU *et al.*, 2020).

3.3.2. CRESCIMENTO E SOBREVIVÊNCIA DE BACTÉRIAS PROBIÓTICAS EM SUCO DE FRUTA

A aplicação de culturas probióticas em sucos de frutas representa um grande desafio. As culturas probióticas quando inseridas em sucos de frutas podem ter o

crescimento e a viabilidade afetados por vários fatores, como acidez, pH, nível de oxigênio, falta de nutrientes e presença de substâncias com ação antimicrobiana (ácido benzoico, compostos fenólicos) (SHAH, 2001). No entanto, de acordo com estudos anteriores, o crescimento e a viabilidade da bactéria probiótica é dependente da espécie e da estirpe utilizada (DAVE; SHAH, 1997).

A fermentação de sucos de frutas por estirpes probióticas acentua várias propriedades nutricionais, tais como a solubilidade de proteínas de origem vegetal, o aumento da biodisponibilidade de aminoácidos livres (essenciais e não essenciais) e ácidos graxos de cadeia curta (PARVEZ *et al.*, 2006; SONG *et al.*, 2008).

Além disso, a fermentação cria condições para que cepas específicas de alguns micro-organismos sintetizem vitaminas, como as vitaminas K e do complexo B, por exemplo (LEBLANC *et al.*, 2013; LEBLANC *et al.*, 2011; BENTLEY; MEGANATHAN, 1982). Reduz, sobremaneira, fatores antinutricionais (SOETAN; OYEWOLE, 2009), acentua a biodisponibilidade de compostos bioativos (TANGYU *et al.*, 2019) e propicia formação de sabores doces e frutados (SETHI *et al.*, 2016).

Os autores de dois estudos com suco de abacaxi fermentado observaram que este é uma matriz viável para o crescimento e estabilidade de sobrevivência das estirpes de *Lactobacillus* e *Bifidobacterium* utilizadas (NGUYEN *et al.*, 2019; COSTA *et al.*, 2013). No experimento de Nguyen *et al.* (2019), após 1 mês a 4 °C, as contagens microbianas nas bebidas, independentemente da adição de prebiótico FOS, permaneceram entre 10^8 e 10^9 UFC/mL para *Lactobacillus* e entre 10^9 e 10^{10} UFC/mL para *Bifidobacterium*.

Outro estudo com suco de abacaxi fermentado, adicionado de *L. casei* NRRL B-442, mostrou redução de contagens e viabilidade probiótica durante 42 dias sob refrigeração. O resultado ao final desse período foi uma contagem superior a 6 log UFC/mL no suco sem açúcar, enquanto no suco adoçado essa contagem persistiu apenas nos primeiros 28 dias. Os autores acreditam que a redução de viabilidade observada no suco adoçado tenha sido devido à presença de açúcar, que promoveu maior pressão osmótica e pós-acidificação (COSTA *et al.*, 2013).

3.3.3. SOBREVIVÊNCIA DE PROBIÓTICOS EM SUCOS GASTROINTESTINAIS SIMULADOS *IN VITRO*

Os probióticos, quando administrados por via oral, encontram vários desafios quando transitam pela boca, estômago, intestino delgado e cólon. Os benefícios para a

saúde proporcionados pela ingestão de probióticos são diminuídos principalmente devido à redução substancial de bactérias probióticas viáveis quando expostas às condições do TGI e à resistência à colonização causada por bactérias comensais (HAN *et al.*, 2021). O TGI é considerado estressante para bactérias probióticas devido à presença de enzimas e sais biliares, bem como o pH ácido do estômago (MELCHIOR *et al.*, 2020).

A capacidade de uma estirpe probiótica de sobreviver às condições estressantes do TGI depende, em primeiro lugar, da sua tolerância ao estresse ácido e à presença de sais biliares. Tais características são consideradas intrínsecas à estirpe (VAN DE GUCHTE *et al.*, 2002). No entanto, vários estudos têm demonstrado que a característica da matriz alimentar pode influenciar profundamente a resistência do micro-organismo às condições estressantes sofridas durante a digestão (PHOEM; CHANTHACHUM; VORAVUTHIKUNCHAI, 2015; RIBEIRO *et al.*, 2019; CAMPOS *et al.*, 2019; GARCIA *et al.*, 2018; NGUYEN *et al.*, 2019; ISLAM *et al.*, 2021).

A resistência a sucos gastrointestinais simulados está entre os ensaios *in vitro* que são frequentemente sugeridos para a avaliação do potencial probiótico da cepa (GBASSI *et al.*, 2011). A verificação da tolerância de micro-organismos probióticos no produto final às condições gastrointestinais pode ajudar a selecionar uma matriz alimentar adequada e contribuir para a sobrevivência e eficácia do probiótico no TGI (BURITI *et al.*, 2010).

Vários estudos têm avaliado a resistência de estirpes probióticas em diferentes sucos de frutas após exposição a digestão simulada em sucos gastrointestinais em ensaios *in vitro* (PHOEM; CHANTHACHUM; VORAVUTHIKUNCHAI, 2015; RIBEIRO *et al.*, 2019; CAMPOS *et al.*, 2019; GARCIA *et al.*, 2018; NGUYEN *et al.*, 2019; ISLAM *et al.*, 2021). Islam *et al.* (2021), em estudo com bebida probiótica fermentada utilizando 75 % de suco de abacaxi e 25 % de soro de coalhada como matriz para a cultura de *L. acidophilus* LA-5, mostraram que esta cepa apresentou uma taxa mínima de sobrevivência de 80 % após 56 dias em refrigeração e a digestão simulada *in vitro*.

No ensaio experimental de Nguyen *et al.* (2019), também com suco de abacaxi fermentado, utilizando *L. acidophilus* La5, *L. plantarum* 299V e *B. lactis* Bb-12, observou-se que após 1 mês a 4 °C e exposição ao estresse da digestão simulada houve redução de apenas 0,11 log UFC/mL e 0,4 log UFC/mL nas contagens após as fases gástrica e entérica, respectivamente. Os autores atribuem à adição de FOS durante o processo de fermentação, assim como à própria fermentação, a estabilidade da sobrevivência dessas células. Também, explicam que a viabilidade poderia ter sido ainda

maior se as bactérias fossem de cultura fresca, não de cultura estoque, cuja resistência ao ambiente ácido parece ser menor.

Embora a exposição a meios com pH de caráter ácido possa ser letal ao micro-organismo, Campos et al. (2019) sugerem, baseados em seus resultados, que a cepa é capaz de se adaptar a essas condições e a fermentação favorece que o micro-organismo se adapte à matriz, como demonstrado em seu estudo com bebida de sucos de juçara e abacaxi suplementada com *L. rhamnosus* GG. As contagens após a fase gástrica não sofreram alterações em relação ao tempo inicial e, mesmo com algumas reduções após as fases entéricas, a contagem final confirmou a aptidão dessa matriz como veículo carreador para a estirpe em questão.

Uma possível explicação para esse comportamento em meio hostil são os mecanismos de tolerância ao meio ácido que algumas BALs com potencial probiótico apresentam, sendo um desses a neutralização do citoplasma das bactérias devido à desaminação ou descarboxilação de aminoácidos. Nessa função, o metabolismo de aminoácidos, especialmente as vias da arginina deaminase e da glutamato descarboxilase, são fundamentais ao controle do pH intracelular das BALs em condições de estresse (WANG; CHELIKANI; SERVENTI, 2018).

Por meio dessas vias, as BALs respondem a condições de ameaça à sobrevivência acumulando aminoácidos como valina, leucina, isoleucina, prolina e arginina no ambiente intracelular (WANG; CHELIKANI; SERVENTI, 2018; WU *et al.*, 2012). Esse acúmulo é responsável pelo aumento do pH no citoplasma, o que oferece proteção contra injúrias celulares (WANG; CHELIKANI; SERVENTI, 2018).

3.3.4. ALTERNATIVAS PARA ACENTUAR A SOBREVIVÊNCIA DE PROBIÓTICOS EM SUCOS DE FRUTAS

Para acentuar a viabilidade de estirpes probióticas em sucos de frutas durante o armazenamento em condições refrigeradas e, também, após exposição a sucos gastrointestinais simulados, algumas estratégias têm sido avaliadas por pesquisadores (SAARELA *et al.*, 2006; SAARELA *et al.*, 2011; NGUYEN *et al.*, 2019; GARCIA *et al.*, 2018; MONTEIRO *et al.*, 2020; PIMENTEL *et al.*, 2015; MOKHTARI; JAFARI; KHOMEIRI, 2018; SOARES, 2016; NUALKAEKUL; DEEPIKA; CHARALAMPOPOULOS, 2012).

Dentre essas estratégias, destaca-se a microencapsulação de micro-organismos probióticos (GARCIA *et al.*, 2018; MONTEIRO *et al.*, 2020; MOKHTARI; JAFARI;

KHOMEIRI, 2018; SOARES, 2016; NUALKAEKUL; DEEPIKA; CHARALAMPOPOULOS, 2012; AFZAAL *et al.*, 2019; ZANJANI *et al.*, 2018). A técnica de microencapsulação de probióticos, para serem incorporados em sucos de frutas, tem sido utilizada a fim de contornar as implicações do meio ácido do suco de fruta na sobrevivência das culturas durante o processamento, refrigeração e passagem pelo TGI (MONTEIRO *et al.*, 2020; AFZAAL *et al.*, 2019; GARCIA *et al.*, 2018; MOKHTARI; JAFARI; KHOMEIRI, 2018; SOARES, 2016; NUALKAEKUL; DEEPIKA; CHARALAMPOPOULOS, 2012).

Entretanto, mesmo com a proteção que oferece e a possibilidade de controlar a liberação de probiótico no intestino (MARTÍN *et al.*, 2015; HUANG *et al.*, 2016; YING *et al.*, 2016), a microencapsulação pode apresentar limitações em sua aplicação. O diâmetro das células bacterianas ou de partículas de uma cultura probiótica liofilizada pode limitar o carregamento de células e, portanto, comprometer sua viabilidade (CHEN *et al.*, 2017; ZUIDAM; NEDOVIC, 2010). Além disso, algumas técnicas e materiais podem ocasionar perda de células durante a microencapsulação (RODRIGUES *et al.*, 2020).

Outra estratégia para acentuar a viabilidade de estirpes probióticas em sucos de frutas tem sido a suplementação com prebióticos e farinhas com alto percentual de fibras (SAARELA *et al.*, 2006; SAARELA *et al.*, 2011; PIMENTEL *et al.*, 2015; NGUYEN *et al.*, 2019). O estudo do comportamento de culturas probióticas em sucos de frutas tem sido avaliado com a adição de prebióticos e fibras, com vistas à estabilidade da sobrevivência e atividade dessas culturas (SAARELA *et al.*, 2006; SAARELA *et al.*, 2011; PIMENTEL *et al.*, 2015; NGUYEN *et al.*, 2019). Prebióticos, como o oligossacarídeo oligofrutose, são fontes de carbono acessíveis às bactérias e contribuem para sua atividade metabólica. Tanto o metabolismo do micro-organismo como a acidez do substrato são condições que têm demonstrado ser essenciais à estabilidade de sobrevivência e atividade de bactérias probióticas em sucos de frutas ao longo do tempo de refrigeração (SAARELA *et al.*, 2006; DONKOR *et al.*, 2007; NUALKAEKUL; DEEPIKA; CHARALAMPOPOULOS, 2012; PIMENTEL *et al.*, 2015).

A adição de oligofrutose a suco de maçã clarificado suplementado com *L. paracasei* subsp *paracasei* teve efeito de aumento na sobrevivência desta estirpe ao final de 28 dias (entre 6,5 e 7 log UFC/mL), enquanto a amostra sem prebiótico ficou com 5,5 e 6 log UFC/mL (PIMENTEL *et al.*, 2015). Além disso, oligofrutose também é capaz de inibir patógenos e proteger cultura de *L. paracasei* subsp *paracasei* em suco de maçã sem

alterar características físico-químicas, tampouco a estabilidade do produto em refrigeração (PIMENTEL *et al.*, 2015).

Na suplementação de suco de maçã com farinha de aveia 20%, β -glucana demonstrou ter efeito protetor notável sobre *L. rhamnosus* E800 e E522 (para fermentação) em pH inicial de 3,5. Somente após quase 8 semanas a 4 °C, a viabilidade de E800 alcançou 5 log UFC/mL, ao passo que E522 exibiu sua menor viabilidade, semelhante ou inferior a de E800, com apenas 2 semanas a 4 °C, (SAARELA *et al.*, 2006). Para todos os efeitos, a atividade das fibras na estabilidade de *L. rhamnosus* E800 e E522 mostrou ser influenciável por fatores do meio como atividade de água, natureza e pH do substrato (SAARELA *et al.*, 2006).

Prebióticos como fruto-oligossacarídeos (FOS), quando adicionados a suco de abacaxi fermentado com *L. acidophilus* La5, *L. plantarum* 299V e *B. lactis* Bb-12, promoveram estabilidade de sobrevivência das culturas num período de 2 meses a 4 °C, após o qual as contagens de UFC foram entre 10^8 e 10^9 para *B. lactis* Bb-12 e entre 10^9 e 10^{10} para *L. acidophilus* La5 e *L. plantarum* 299V (NGUYEN *et al.*, 2019). Além disso, as alterações observadas em parâmetros físico-químicos como pH e acidez titulável foram mínimas e compatíveis com os resultados de sobrevivência e viabilidade descritos.

Oligossacarídeos com ação prebiótica também são encontrados no grão-de-bico, cuja aptidão como veículo carreador de BALs probióticas tem sido estudada em bebidas vegetais fermentadas ou suplementadas com culturas probióticas, onde o grão-de-bico tem demonstrado contribuir para o crescimento e sobrevivência desses micro-organismos (WANG; CHELIKANI; SERVENTI, 2018; SKRZYPCZAK *et al.*, 2019; MESQUITA *et al.*, 2020; LOPES *et al.*, 2020; RINCON; BOTELHO; ALENCAR, 2020).

3.4. GRÃO-DE-BICO

O grão-de-bico (*Cicer arietinum* L.) é a segunda leguminosa mais produzida no mundo, com uma média de 12,1 milhões de toneladas ao ano. Os principais países produtores são a Índia, o Paquistão e a Turquia. No Brasil, as condições climáticas são favoráveis ao cultivo dessa leguminosa. O Cerrado e o norte de Minas Gerais são promissores para a produção de grão-de-bico, com produtividade de cerca de 2 a 4 toneladas por hectare (FAO, 2018).

O valor nutritivo e funcional do grão-de-bico se deve aos seus nutrientes, fibras dietéticas e compostos bioativos. Entre os macronutrientes, os carboidratos correspondem à maior parte, 62 a 70 %, principalmente oligossacarídeos (144,9 mg/g) (HUSSEIN *et al.*,

2020), que têm função prebiótica (MARTINEZ-VILLALUENGA *et al.*, 2006), como α -galactosídeos, e polissacarídeos, como amido, cuja fração resistente ou não disponível é de 35 %. As fibras dietéticas compõem 18 a 22 %, dos quais 4 a 8 % são solúveis e 10 a 18 %, insolúveis (RACHWA; NEBESNY; BUDRYN, 2015; PITTAWAY *et al.*, 2007; JUKANTI *et al.*, 2012).

O segundo nutriente em maior quantidade são as proteínas, com concentração que varia de 21 a 25 % (RACHWA-ROSIK; NEBESNY; BUDRYN, 2015), digestibilidade de 48 a 89,01 % e um *pool* completo de aminoácidos (WANG *et al.*, 2010; KOU *et al.*, 2013). Essas proteínas não apenas têm uma proporção adequada de aminoácidos, como contêm todos os aminoácidos essenciais e por isto são de alto valor biológico. Entre os aminoácidos essenciais mais presentes, estão a leucina (8 a 8,5 g/100 g de proteína) (CORTÉS-GIRALDO *et al.*, 2016; RACHWA; NEBESNY; BUDRYN, 2015), fenilalanina (5,3 a 6 g/100 g de proteína) (RACHWA; NEBESNY; BUDRYN, 2015; CORTÉS-GIRALDO *et al.*, 2016) e lisina (7 a 7,2 g/100 g de proteína) (RACHWA; NEBESNY; BUDRYN, 2015; CORTÉS-GIRALDO *et al.*, 2016).

Os lipídeos contribuem com a menor parte – 4 a 10 % - e, entre seus principais ácidos graxos, estão os insaturados, sobretudo linoleico (54,7 a 56,2 %), oleico (21,6 a 22,2 %) e linolênico (0,5 a 0,9 %) (RACHWA; NEBESNY; BUDRYN, 2015; ZIA-UL-HAQ *et al.*, 2007; SARMENTO *et al.*, 2015).

Entre os micronutrientes, os mais encontrados no grão-de-bico são as vitaminas do complexo B (tiamina – 0,52 mg/100 g e piridoxina – 0,75 mg/100 g) e minerais como potássio (1116 mg/100 g), fósforo (342 mg/100 g), magnésio (146 mg/100 g), cálcio (114 mg/100 g), ferro (5,4 mg/100 g), sódio (5 mg/100 g), zinco (3,2 mg/100 g) e manganês (3,16 mg/100 g) (JUKANTI *et al.*, 2012; THAVARAJAH; THAVARAJAH, 2012; EL-ADAWY, 2002; NEPA/UNICAMP, 2011).

Além de um rico conteúdo nutricional, o grão-de-bico é rico em substâncias bioativas não nutrientes, como compostos fenólicos (ácidos fenólicos e flavonoides) e carotenoides (AROOJ *et al.*, 2021). Entre os compostos fenólicos, a predominância é de isoflavonoides (DE CAMARGO *et al.*, 2019), com destaque para isoflavonas (153 a 340 mg/100 g de grão-de-bico) (CANTELLI *et al.*, 2017; SINGH *et al.*, 2017). Além desses, encontram-se no grão-de-bico os peptídeos bioativos, o que também expressam atividade antioxidante (FARIDY *et al.*, 2020).

Como alternativa viável à soja e ao leite, o grão-de-bico tem sido utilizado no desenvolvimento de bebidas vegetais em alguns estudos, os quais indicam sua aptidão como matriz alimentar na produção dessas bebidas, inclusive como veículo de probiótico

(SKRZYPCZAK *et al.*, 2019; MESQUITA *et al.*, 2020; RINCON; BOTELHO; ALENCAR, 2020).

Como matriz carreadora de agentes probióticos, a eficiência do grão-de-bico foi observada no estudo de Mesquita *et al.* (2020), em bebida vegetal de extratos de grão-de-bico e coco fermentada, na qual *L. paracasei* subsp. *paracasei* LBC 81 teve uma sobrevivência estável a 4 °C e viabilidade superior a 8 log UFC/mL. Nas condições de refrigeração, os oligossacarídeos do grão-de-bico – rafinose, estaquiase e ciceritol -, por sua competência como prebióticos, têm demonstrado colaborar para a manutenção do crescimento e sobrevivência de BALs durante o tempo de vida de prateleira em contagens superiores a 10⁶ de UFC/g (HUSSEIN *et al.*, 2020).

Na simulação das fases da digestão humana *in vitro*, confirmou-se a função protetora do grão-de-bico sobre *L. paracasei* subsp. *paracasei* LBC 81 (MESQUITA *et al.*, 2021). A resistência à acidez que essa estirpe demonstrou na fase gástrica pode ser explicada pelos mecanismos clássicos que as BALs utilizam quando em contato com o meio ácido, como a desaminação de aminoácidos (via arginina deaminase) e a descarboxilação de aminoácidos (via glutamato descarboxilase) (CORTÉS-GIRALDO *et al.*, 2016; WANG; CHELIKANI; SERVENTI, 2018). A hipótese levantada pelos autores é que os aminoácidos do grão-de-bico, como arginina (JUKANTI *et al.*, 2012; CORTÉS-GIRALDO, 2016), foram utilizados nos mecanismos de sobrevivência supracitados, pelos quais as células são protegidas de injúrias do pH ácido no estômago e, então, podem sobreviver até a passagem pelo intestino delgado (ID).

Outra característica do grão-de-bico que se atribui ao seu efeito positivo na viabilidade de BALs probióticas é o volume de proteínas (SIDHU *et al.*, 2020). Na passagem pelo ID, a proteína parece criar uma barreira física para a bactéria ao se ligar a uma parte dos sais biliares e, assim, protegê-la do ambiente muito alcali (pH 8,0) e da ação da bile, que tem propriedades antimicrobianas (MARAGKOUidakis *et al.*, 2006; HAVENAAR; BRINK; HUIS, 1992). Desse modo, a proteína impede o acúmulo de bile e agregação de proteínas no citoplasma e comprometimento da homeostase celular da bactéria (SANCHEZ *et al.*, 2008).

4. METODOLOGIA

4.1. TIPO DE ESTUDO

Trata-se de um estudo experimental quantitativo e qualitativo que foi subdividido nas seguintes etapas: (1) elaboração da bebida adicionada de *L. paracasei* LBC 81, (2) caracterização físico-química das bebidas antes do armazenamento e sob refrigeração, (3) análises microbiológicas durante a vida útil das bebidas, (4) determinação da sobrevivência de *L. paracasei* sob condições simuladas gastrointestinais, (5) determinação de bolores e leveduras e (6) determinação de sinérese.

4.2. ELABORAÇÃO DO SUCO DE ABACAXI E O EXTRATO DE GRÃO-DE-BICO

O extrato vegetal de grão-de-bico e o suco de abacaxi foram produzidos no Laboratório de Técnica Dietética da Faculdade de Ciências Saúde (FS) da Universidade de Brasília (UnB), conforme os protocolos estabelecidos por Rincon, Botelho e Alencar (2020) e Campos et al. (2019), respectivamente.

4.2.1. ELABORAÇÃO DO EXTRATO VEGETAL DE GRÃO-DE-BICO

O grão-de-bico (Bella Grãos, Agropecuária Garbanzo LTDA) utilizado na elaboração do extrato foi adquirido no comércio local de Brasília, Distrito Federal. A produção do extrato foi realizada em quatro etapas, que consistiram em reidratação, cocção, homogeneização e filtração do grão processado, para separação do resíduo e o extrato vegetal. O peso bruto de grão-de-bico que foi utilizado consistiu em 1.575,39 g.

Na etapa de reidratação, grão-de-bico cru e água potável foram utilizados na proporção de 1:4 (uma parte de grão para quatro partes de água), respectivamente. O tempo de remolho foi de 10 horas, seguido de descarte da água. Subsequentemente, cozinhou-se o grão-de-bico com água em uma proporção de 1:3 (uma parte de grão para três partes de água) em panela de pressão de uso doméstico (Rochedo[®]), a uma temperatura de 120 °C e pressão de 2,0 atm, por 20 minutos (ao iniciar a pressão). Após a cocção, homogeneizou-se o grão-de-bico com a água que restou do cozimento e uma quantidade de água adicional para completar a proporção de 4 para 1 de massa seca (Thermomix[™], Vorwerk). Para finalizar, a mistura resultante foi coada em tecido voal para obtenção do extrato vegetal.

4.2.2. ELABORAÇÃO DO SUCO DE ABACAXI

Para a produção de suco fresco e natural de abacaxi (*Ananas comosus L.*, variedade Pérola), a polpa foi a parte utilizada. Um lote da fruta em estado adequado de maturação (SANTANA; MEDINA, 2000; BRASIL, 2012; CEAGESP, 2013) foi obtido do comércio local de Brasília (DF).

Primeiramente, as frutas foram lavadas em 8 L de água corrente e sanitizadas com 2,66 g (0,3325 % m/v) de Hidrosan Plus® (HidroAll) por 20 minutos. Após o processo de sanitização, o abacaxi foi descascado e cortado em pedaços e armazenado em porções de 200 g em sacos plásticos selados a vácuo. As polpas obtidas foram, logo em seguida, armazenadas em ultra *freezer* (MDF U54VC) a -80 °C (CAMPOS *et al.*, 2019).

Para o preparo do suco, 400 g (controle), 360 g (tratamento 1) e 320 g (tratamento 2) de polpa de abacaxi foram processados em liquidificador (Philips Walita® modelo RI2112/90) em potência 2 constante por 3 minutos (CAMPOS *et al.*, 2019). Contudo, apenas os volumes de suco de abacaxi foram utilizados para a produção de F1, F2 e F3, respectivamente: 270 mL, 243 mL e 216 mL. O volume excedente foi reservado.

4.2.3. ELABORAÇÃO DE DIFERENTES FORMULAÇÕES DA BEBIDA VEGETAL À BASE DE SUCO DE ABACAXI E EXTRATO DE GRÃO-DE-BICO

A bebida foi elaborada com diferentes proporções do extrato de grão-de-bico e suco de abacaxi. Foram preparadas três formulações da bebida: (i) 100 % suco de abacaxi + 0 % extrato de grão-de-bico; (ii) 90 % suco de abacaxi + 10 % extrato de grão-de-bico; (iii) 80 % suco de abacaxi + 20 % extrato de grão-de-bico. Dentre essas formulações, a formulação sem adição de extrato de grão-de-bico foi usada como controle do experimento. Todos os tratamentos foram divididos em três partes iguais para análises em triplicata, sendo distribuídos 270 mL em potes de vidro com tampa rosqueável. As bebidas foram transportadas em caixa térmica para o Laboratório de Higiene dos Alimentos para aplicação do tratamento térmico e realização das análises microbiológicas.

Então, as formulações foram submetidas à pasteurização lenta a 65 °C por 15 minutos e, em seguida, resfriadas à temperatura ambiente e refrigeradas a 4 °C. A partir dessas formulações refrigeradas, foi adicionado o concentrado de células da cultura de *L. paracasei* subsp. *paracasei* LBC 81 (DuPont™).

4.3. CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA DAS FORMULAÇÕES DE BEBIDA À BASE DE SUCO DE ABACAXI E EXTRATO DE GRÃO-DE-BICO

As formulações foram avaliadas quanto às características físico-químicas antes da adição do concentrado de células de *L. paracasei* LBC 81.

4.3.1. pH

Para a medição do pH das diferentes formulações, foi usado um pHmetro de bancada digital (PHS – 3E, EVEN®). Mediu-se um volume de 10 mL de cada formulação em béquer de vidro, onde o bulbo do pHmetro foi inteiramente submerso. Após alguns segundos, com a estabilização do valor de potencial do eletrodo, este foi obtido em unidades de pH (IAL, 2008).

4.3.2. ACIDEZ TITULÁVEL

Para a determinação da acidez titulável, utilizou-se a metodologia descrita pelo Instituto Adolfo Lutz (2008). Para isso, foram coletados 10 mL de cada amostra, aos quais foram adicionados 100 mL de água destilada. Assim, realizou-se o procedimento de titulação convencional com solução de hidróxido de sódio (NaOH) na concentração de 0,1 mol L⁻¹ e indicador fenolftaleína. Para obtenção dos resultados, que foram expressos em g/100 g de ácido, a seguinte equação (equação 1) foi utilizada.

$$\text{Acidez titulável} = \frac{V \times f \times M \times 100}{P}$$

Em que:

V = volume de solução de NaOH gasto na titulação (mL)

f = fator de correção da solução de NaOH

P = massa da amostra (g) ou volume pipetado em mL

M = molaridade da solução de hidróxido de sódio

4.3.3. SÓLIDOS SOLÚVEIS TOTAIS

Para a determinação do teor de sólidos solúveis totais (TSST), utilizou-se um refratômetro digital (Atago, modelo 1T, Japão), segundo o método 932.12 (AOAC, 2005). Com o auxílio de pipetas Pasteur descartáveis, coletaram-se alíquotas de cada amostra homogeneizada, que foram depositadas no visor do aparelho. Os resultados foram expressos em °Brix.

4.3.4. UMIDADE

Determinou-se o teor de umidade das amostras segundo as Normas Analíticas do Instituto Adolfo Lutz (2008), sendo o procedimento realizado em duas etapas. Primeiramente, pesaram-se as amostras (300 g) em recipientes de porcelana. Posteriormente, os recipientes foram colocados em estufa (Marconi, MA035) com circulação de ar a 60 °C por um período de 24 horas, para evaporação parcial da água e concentração da matriz, até ser obtido peso constante.

Então, pesaram-se 10 g de cada amostra em cadinhos, que foram colocados em estufa com circulação de ar a 105 °C por 4 horas, até ser obtido peso constante. Para evitar o contato das amostras com a umidade do meio externo e mantê-las secas, foram dispostas em um dessecador de vidro com agente dessecante sílica gel. A diferença de peso foi calculada e os valores obtidos corresponderam à umidade a 105 °C. O resultado do teor de umidade foi expresso em porcentagem de base úmida, utilizando-se a seguinte equação (equação 2):

$$\text{Umidade (\%)} = \frac{(m_1 + m_2)}{m_t}$$

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 da amostra (g)

4.3.5. RESÍDUO MINERAL

Para obtenção do teor de elementos minerais ou cinzas, aplicou-se o método 945.45 (AOAC, 2005). Para isso, os cadinhos com 10 g de cada amostra que antes passaram pela estufa com circulação de ar a 105 °C foram posicionados em mufla a 600

°C (Edgcon 3P, EDG). Após essa etapa, foram pesados novamente. Determinou-se o conteúdo referente ao resíduo inorgânico ou mineral com a perda de matéria orgânica de cada amostra, assim como o percentual de cinzas, com a seguinte equação (equação 3):

$$\% \text{ Cinzas} = \frac{100 \times m_c}{m}$$

Em que:

m_c = massa de cinzas (g)

m = massa da amostra (g)

4.3.6. PROTEÍNA

Para determinação do teor de proteína das amostras, empregou-se o método de Kjeldahl 991.22 (AOAC, 2005). Aproximadamente, 2 g de cada amostra foram colocados em tubos de digestão de proteína contendo 1 g de mistura catalítica. Então, 3,5 mL de H₂SO₄ 4 % foram adicionados e, em seguida, os tubos foram colocados no equipamento de digestão de proteína (Tecnal[®], TE-007 MP), programado para temperatura de 450 °C por cerca de 4 horas.

Na sequência, os tubos foram retirados do bloco digestor e levados para destilação de nitrogênio no equipamento destilador (Tecnal[®], TE – 0363). Para cada amostra, foram adicionados 7,5 mL de H₃BO₃ em béqueres de vidro e 4 gotas de azul de metileno foram usadas como indicador.

Os tubos contendo as amostras e os béqueres com solução ácida (ácido bórico) foram colocados no destilador de proteínas. A solução de NaOH 50 % foi adicionada ao copo medidor do aparelho e, em seguida, iniciou-se o processo de destilação.

Para finalizar, fez-se a titulação da solução destilada usando HCl 0,1 M até que as amostras atingissem o ponto de mudança de cor. O total de nitrogênio de cada amostra foi expresso em porcentagem pela seguinte equação (equação 4):

$$\% \text{ N} = \frac{V \times M \times f \times 14 \times 100}{m}$$

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 quantidade de proteína presente em cada amostra foi determinada pela multiplicação do resultado para o teor de nitrogênio pelo fator de conversão de nitrogênio (% N), que é 6,25, conforme a seguinte equação (equação 5):

$$\% \text{ Proteína} = \% \text{ N} \times 6,25$$

4.3.7. LIPÍDEO

Para a determinação do teor lipídico total, empregou-se o método de extração Am 5-04 (AOCS, 2005), utilizando o extrator de lipídeos (Ankom Technology, ANKOM XT15). Primeiramente, as amostras foram mantidas em estufa a 60 °C por 24 horas, para evaporação parcial da água e concentração da matriz, conforme descrito no item 4.2.4.

A medida de 1 g de cada amostra foi pesada em balança analítica (BEL Engineering), colocada em saco de extração de lipídeos e alocada em cartucho do extrator de lipídeos. Como solvente para o procedimento de extração, utilizou-se éter de petróleo. Depois, as amostras foram mantidas em estufa a 105 °C por 1 hora, para evaporação do solvente; transferidas para o dessecador de vidro por 15 minutos, para manter as amostras secas e sem exposição à umidade; e, por fim, pesadas.

Finalmente, para obtenção dos valores de lipídeo nas amostras calculou-se a diferença de massa após a extração, e a massa de cada amostra em base úmida também foi utilizada. Assim, o total de lipídeo das amostras foi determinado pela seguinte equação (equação 6):

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

Em que:

m_L = gramas de lipídeos extraídos

m = gramas de amostra em base úmida

4.3.8. CARBOIDRATO E VALOR CALÓRICO

Para a determinação do teor de carboidratos totais presente nas diferentes formulações, efetuou-se a diferença entre o percentual total e o somatório dos percentuais encontrados para umidade, proteína, lipídeo e cinzas, conforme o método 986.25 (AOAC, 2005). Os valores de carboidratos totais foram obtidos pela seguinte equação (equação 7):

$$\% \text{ CHO} = 100 - \% \text{ Umidade} - \% \text{ Proteína} - \% \text{ Lipídeo} - \% \text{ Cinzas}$$

Para o cálculo do valor energético de cada formulação, as quantidades em gramas de carboidratos, proteínas e lipídios foram multiplicadas por 4 Kcal, 4 Kcal e 9 Kcal, respectivamente, segundo Mahan e Escott-Stump (2005).

4.3.9. FIBRA BRUTA

Os procedimentos para a análise de determinação do teor de fibra bruta foram realizados conforme o método 978.10 da AOAC (2005), com modificação. Primeiramente, a partir das amostras que foram parcialmente secas na estufa a 60 °C foram pesados aproximadamente 1,5g de cada amostra em saquinhos próprios para esta análise, que foram levados para estufa com circulação de ar a 105 °C por 3 horas.

Então, iniciaram-se os procedimentos de digestão ácida e básica. Para a digestão ácida, uma solução ácida foi preparada contendo 16 mL de H₂SO₄ 1,25 % e 1.000 mL de água destilada. Os sacos contendo as amostras foram colocados em um Erlenmeyer onde foram imersos em solução ácida (AOAC, 2005). Em seguida, o Erlenmeyer contendo os sacos com as amostras foi autoclavado a 100 °C por 30 minutos. Após isso, os sacos foram enxaguados com água destilada e colocados em Erlenmeyer com 1000 mL de água destilada, que foi autoclavado a 100 °C por 30 minutos (AOAC, 2005).

Para a digestão básica, uma solução básica contendo 25 mL de NaOH a 1,25 % e 1000 mL de água destilada foi preparada e adicionada a um Erlenmeyer com os sacos contendo as amostras, que foi autoclavado a 100 °C por 30 minutos. Depois disso, os sacos foram enxaguados com água destilada e colocados em um Erlenmeyer onde foram imersos em 1000 mL de água destilada, que foi autoclavado a 100 °C por 30 minutos (AOAC, 2005).

Por fim, os sacos foram imersos em acetona e expostos à temperatura ambiente para secar. Depois, foram colocados em estufa a 105 °C por 2 horas e, finalmente, pesados (AOAC, 2005).

Para obtenção dos valores de fibra bruta nas amostras, calculou-se a massa de cada amostra em base úmida e em base seca. Assim, o total de fibra bruta das amostras foi determinado pela seguinte equação (equação 8):

Cálculo

$$\% \text{ Fibras} = (P_{\text{dg}} - P_{\text{s}}) \div (m_{\text{úmida}} \times 100)$$

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

P_{s} = Peso do saquinho

$m_{\text{úmida}}$ = massa da amostra em base úmida

4.4. ELABORAÇÃO DA BEBIDA ADICIONADA DE PROBIÓTICO

4.4.1. OBTENÇÃO DA CULTURA ESTOQUE DE *L. PARACASEI* LBC 81

A cultura de *L. paracasei* LBC 81 (DuPont™) é uma cultura probiótica comercial que foi utilizada neste estudo. A cultura foi cultivada em meio de cultura MRS (Acumedia®) e incubada em estufa bacteriológica (Ethik Technology) a 37 °C por aproximadamente 16 horas. Um segundo subcultivo foi realizado em caldo MRS (inóculo de 2 %) e, posteriormente, foi centrifugado (2655 g, 4 °C, 10 minutos) (MESQUITA *et al.*, 2020). O sedimento de células obtido foi lavado uma vez em solução salina a 0,85 % (Cromoline Química Fina) e, após, ressuspenso em 4 mL de caldo MRS adicionado de glicerol com concentração final de 20 %. A suspensão de células foi distribuída em tubos criogênicos (4 tubos com capacidade de 1 mL cada), que foram armazenados em *ultrafreezer* a -80 °C. Todos os experimentos foram realizados a partir dessa cultura estoque (MESQUITA *et al.*, 2020).

4.4.2. OBTENÇÃO DO CONCENTRADO DE CÉLULAS PARA ADIÇÃO NAS DIFERENTES FORMULAÇÕES

A cultura estoque de *L. paracasei* LBC 81 foi ativada em 5 mL de caldo MRS e incubada em estufa bacteriológica a 37 °C por 16 horas. A cultura ativa foi inoculada (inóculo de 1 %) em nove tubos contendo 30 mL de caldo MRS e imediatamente incubada a 37 °C por 16 horas. A cultura crescida foi centrifugada (2655 g, 4 °C, 10 minutos) e o sedimento de células obtido foi lavado em solução salina a 0,85 %. Em seguida, a suspensão de células em salina foi centrifugada nas mesmas condições mencionadas anteriormente (MESQUITA *et al.*, 2020).

O sedimento de células de cada tubo foi ressuspensionado nas diferentes formulações da bebida de suco de abacaxi e extrato de grão-de-bico. Após a homogeneização, as bebidas adicionadas do concentrado de células foram submetidas a análises microbiológicas e físico-químicas. Uma parte das formulações foi armazenada a 4 °C e analisada com 0, 7, 14, 21 e 28 dias de armazenamento (MESQUITA *et al.*, 2020).

4.4.3. ANÁLISE DAS BEBIDAS ADICIONADAS DO CONCENTRADO DE CÉLULAS

4.4.3.1. ANÁLISE MICROBIOLÓGICA

4.4.3.1.1. DETERMINAÇÃO DA VIABILIDADE DE *L. PARACASEI* LBC 81

As diferentes formulações da bebida de abacaxi e extrato de grão-de-bico foram analisadas quanto à viabilidade de *L. paracasei* LBC 81. As bebidas foram submetidas a diluições seriadas em solução salina a 0,85 % e, posteriormente, as diluições selecionadas foram plaqueadas pela técnica *Drop plate* em placas de Petri contendo ágar MRS. As placas foram incubadas a 37 °C por 24 horas. Após o período de incubação, determinou-se o número de Unidades Formadoras de Colônias (UFC) (FLEMING MCFEETERS; BREIDT, 2001).

4.4.3.1.2. DETERMINAÇÃO DE BOLORES E LEVEDURAS

As diferentes formulações das bebidas foram avaliadas quanto à presença de bolores e leveduras pela técnica de plaqueamento *Pour plate*. O volume de 1 mL de cada formulação foi transferido para uma placa de Petri vazia e, imediatamente, foram adicionados aproximadamente 20 mL do meio ágar Dicloran Rosa Bengala Cloranfenicol (DRBC) (Neogen[®], Michigan, USA). Posteriormente, as placas foram incubadas em estufa bacteriológica a 25 °C por 5 dias. Após a incubação, as placas contendo entre 15 e 150 colônias foram selecionadas para determinação do número de UFC (BEUCHAT e COUSIN, 2001).

4.4.3.2. ANÁLISES FÍSICO-QUÍMICAS

As diferentes formulações da bebida foram analisadas quanto ao pH, acidez titulável, sólidos solúveis totais e sinérese antes e durante o armazenamento a 4 °C. O

procedimento metodológico foi realizado conforme descrito nos itens 4.2.1, 4.2.2, 4.2.3, 4.3.3.2.2, 4.3.3.3.

4.4.3.2.1. DETERMINAÇÃO DE SINÉRESE

A avaliação da estabilidade física das formulações das bebidas probióticas foi determinada dentro de um período de 72 horas a 4 °C, por meio de análise de separação de fase (ZAABOUL *et al.*, 2019). O volume de 10 mL de cada formulação foi transferido para tubos de vidro e avaliado a cada 24 horas. A separação de fases das formulações foi determinada com auxílio de uma régua (RINCON; BOTELHO; ALENCAR, 2020).

4.5. DETERMINAÇÃO DA SOBREVIVÊNCIA DE *L. PARACASEI* LBC 81 EM SUCOS GASTROINTESTINAIS SIMULADOS *IN VITRO*

As formulações da bebida de suco de abacaxi e extrato de grão-de-bico adicionadas do concentrado de células de *L. paracasei* LBC 81 foram avaliadas quanto à sobrevivência a condições simuladas gástricas e intestinais no 7º dia de armazenamento em refrigeração (4 °C).

Simulação gástrica: o suco gástrico foi preparado de acordo com Bautista-Gallego *et al.* (2013), com modificação. Neste experimento, utilizou-se suco gástrico sintético, que foi elaborado com NaCl (0,205 g/L), K₂HPO₄ (0,06 g/L), KCl (0,037 g/L) e água destilada. Na sequência, o pH da solução tampão foi ajustado para 2,0 com solução HCl 1 M. A solução foi autoclavada a 121°C por 15 minutos e, antes do uso, foi adicionada de pepsina (0,0133 g/L) (Dinâmica[®], Indaiatuba, Brasil).

Como primeiro procedimento da simulação da digestão em suco gástrico sintético, alíquotas de 500 µL das bebidas foram adicionadas a 500 µL de suco gástrico e incubadas em estufa bacteriológica a 37 °C por 90 minutos. O tempo de exposição ao suco gástrico foi estabelecido com base no estudo de Calabuig-Jiménez *et al.* (2019). Com o término do período de incubação das respectivas formulações, os tratamentos foram centrifugados (6797 g, 4 °C, 5 minutos) e submetidos a diluições seriadas em solução salina a 0,85 %. As diluições seriadas selecionadas foram plaqueadas pela técnica *Drop plate* em placas contendo ágar MRS (Kasvi[®], Espanha). As placas foram incubadas a 37 °C por 24 horas. Os resultados foram expressos em log UFC/mL. Do mesmo modo, procedeu-se com a suspensão de células em bebida de suco de abacaxi sem extrato de grão-de-bico (controle).

Simulação intestinal: o suco pancreático foi preparado com solução tampão contendo fosfato de sódio dibásico (5,081 g/L), NaCl (0,85 g/L), sais biliares (0,3 g/L) (Sigma-Aldrich®, New Zealand) e água destilada. O pH foi ajustado para 8,0 com auxílio de solução de NaOH 1 M. A solução foi autoclavada a 121 °C por 15 minutos e, antes do uso, adicionou-se pancreatina (0,1 g/L) (Sigma-Aldrich®, St. Louis, Missouri, USA/Steinheim, Germany).

Alíquotas de 500 µL das bebidas foram adicionadas a 500 µL de suco pancreático e, em seguida, incubadas em estufa bacteriológica a 37 °C por 90 minutos. O tempo de exposição ao suco pancreático foi estabelecido com base no estudo de Calabuig-Jiménez et al. (2019). Com o término do período de incubação das respectivas formulações, os tratamentos foram centrifugados (6797 g, 4 °C, 5 minutos) e submetidos a diluições seriadas em solução salina a 0,85 %. As diluições seriadas selecionadas foram plaqueadas pela técnica *Drop plate* em placas contendo ágar MRS. As placas foram incubadas a 37 °C por 24 horas. Os resultados foram expressos em log UFC/mL. Do mesmo modo, procedeu-se com a suspensão de células em bebida de suco de abacaxi sem extrato de grão-de-bico (controle).

Sucessão gástrica e intestinal: este processo foi realizado conforme os métodos descritos anteriormente. No entanto, a bebida de suco de abacaxi e extrato de grão-de-bico foi exposta aos sucos gástrico e pancreático sequencialmente: a exposição ao suco gástrico foi com adição de alíquotas de 500 µL de bebida a 500 µL de suco gástrico, incubação por 90 minutos em estufa bacteriológica a 37 °C, seguida de centrifugação (6797 g, 4 °C, 5 minutos). Nessa ordem, procedeu-se à exposição da bebida ao suco pancreático, com adição de 1 mL de suco pancreático, incubação por 90 minutos a 37 °C, centrifugação (6797 g, 4 °C, 5 minutos) e ressuspensão do *pellet* em solução salina a 0,85 % (Cromoline Química Fina). As diluições seriadas selecionadas foram plaqueadas pela técnica *Drop plate* em placas contendo ágar MRS. As placas foram incubadas em estufa a 37 °C por 24 horas. Os resultados foram expressos em log UFC/mL. Do mesmo modo, procedeu-se com a suspensão de células em bebida de suco de abacaxi sem extrato de grão-de-bico (controle).

4.6. DESENHO EXPERIMENTAL E ANÁLISE ESTATÍSTICA

O desenho experimental do estudo inclui 3 formulações e cinco diferentes medidas em intervalos de tempo de armazenamento (exceto para análise de composição centesimal, bolores e leveduras e de sobrevivência a condições simuladas do trato gastrointestinal). Todos os experimentos foram realizados três vezes, 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 a análise de regressão. As análises foram realizadas usando o software SAS (SAS Institute Inc., Cary NC, versão 9.4).

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. COMPOSIÇÃO QUÍMICA DE DIFERENTES FORMULAÇÕES DE BEBIDA DE SUCO DE ABACAXI E EXTRATO DE GRÃO-DE-BICO

A composição centesimal das formulações de bebida de suco de abacaxi e extrato de grão-de-bico foi determinada antes da pasteurização e adição do concentrado de células de *L. paracasei* subsp *paracasei* LBC 81 (Tabela 1).

Tabela 1 - Composição centesimal das bebidas

Variáveis	Formulações (F) ¹			EPM	p-valor
	F1	F2	F3		
Umidade (%)	88,09a	88,25a	88,97a	0,1931	0,1359
Lipídeos (%)	0,20a	0,21a	0,20a	0,0063	0,8436
Proteínas (%)	0,83c	0,99b	1,12a	0,0423	<0,0001
Cinzas (%)	0,21b	0,22b	0,35a	0,0243	0,0041
Fibra bruta (%)	0,05b	0,15b	0,48a	0,0718	0,0084
Carboidratos(%)	10,59a	10,02ab	8,99b	0,2755	0,0208

¹F1 = 100 % suco de abacaxi; F2 = 90 % suco de abacaxi + 10 % extrato de grão-de-bico; F3 = 80 % suco de abacaxi + 20 % extrato de grão-de-bico.

Médias seguidas das mesmas letras na linha não diferem estatisticamente uma da outra ($p > 0,05$) pelo teste Tukey.

EPM: erro padrão da média

Entre os valores para o teor de umidade das formulações, não se observaram diferenças significativas ($p > 0,05$), assim como para o teor de lipídeos. A adição de extrato de grão-de-bico às bebidas não alterou significativamente ($p > 0,05$) o percentual de lipídeos das formulações, visto que não se observou variação entre os percentuais de

lipídeos da formulação controle (F1) e das formulações com 10 % (F2) e 20 % de extrato (F3). Esse resultado era previsto, uma vez que tanto o suco de abacaxi como o extrato de grão-de-bico possuem baixas concentrações de lipídeos (suco de abacaxi: entre 0,1 % e 0,26 %; extrato de grão-de-bico: cerca de 0,39 %), portanto as diferenças nas quantidades de extrato e/ou suco adicionadas não modificaram o teor de lipídeos das bebidas (GHAFARI; ANSARI, 2018; ANSES, 2020; RINCON; BOTELHO; ALENCAR, 2020).

Os valores de proteínas entre as formulações apresentaram diferenças significativas ($p < 0,05$) à medida que maior foi o volume de extrato de grão-de-bico adicionado. A formulação elaborada com 20 % de extrato (F3) apresentou o maior percentual de proteínas entre as formulações. Esses resultados são esperados, uma vez que frutas possuem baixa concentração de proteínas (FAO, 1981; SESI, 2020) e o grão-de-bico é um alimento rico em proteínas (WANG *et al.*, 2010; KOU *et al.*, 2013; RACHWA-ROSIK; NEBESNY; BUDRYN, 2015). Além disso, como o suco de abacaxi contém, em média, 0,43 % de proteína e o extrato de grão-de-bico, 2,1 %, é coerente que o menor percentual de proteína obtido tenha sido na bebida elaborada somente com suco de abacaxi (GHAFARI; ANSARI, 2018; RINCON; BOTELHO; ALENCAR, 2020).

Quanto ao teor de cinzas, os valores médios obtidos mostram que houve diferenças significativas ($p < 0,05$) entre a formulação controle (F1) e a formulação com 90 % de suco de abacaxi e 10 % de extrato de grão-de-bico (F3), tal como entre a formulação com 80 % de suco de abacaxi e 20 % de extrato (F2) e F3. O percentual de cinzas obtido para a formulação com 10 % de extrato de grão-de-bico (F2) não apresentou diferença significativa ($p > 0,05$) quando comparada a F1 (100 % suco de abacaxi). No entanto, com o acréscimo de 20 % de extrato de grão-de-bico observou-se aumento significativo ($p < 0,05$) em relação às formulações F1 e F2. Assim, demonstrou-se que quanto maior o percentual de extrato adicionado maior foi o teor de cinzas da bebida. Esses resultados estão de acordo com os resultados obtidos para a bebida de suco de abacaxi do estudo de Ghafari e Ansari (2018), em que as bebidas adicionadas de sacarose ou inulina apresentaram percentuais de cinzas significativamente maiores ($p < 0,05$) do que a bebida controle (suco de abacaxi sem adição de prebiótico e/ou cultura probiótica).

Para os valores médios de fibra bruta, observaram-se diferenças significativas entre os valores obtidos para F1 e F3 ($p < 0,05$), com variação de 0,05 % na formulação controle (F1) a 0,48 % na formulação com 20 % de extrato de grão-de-bico (F3). Outra diferença significativa observada foi entre as formulações com diferentes percentuais de extrato de grão-de-bico (F2 e F3). Para a bebida F3, com apenas 10 % a mais de extrato

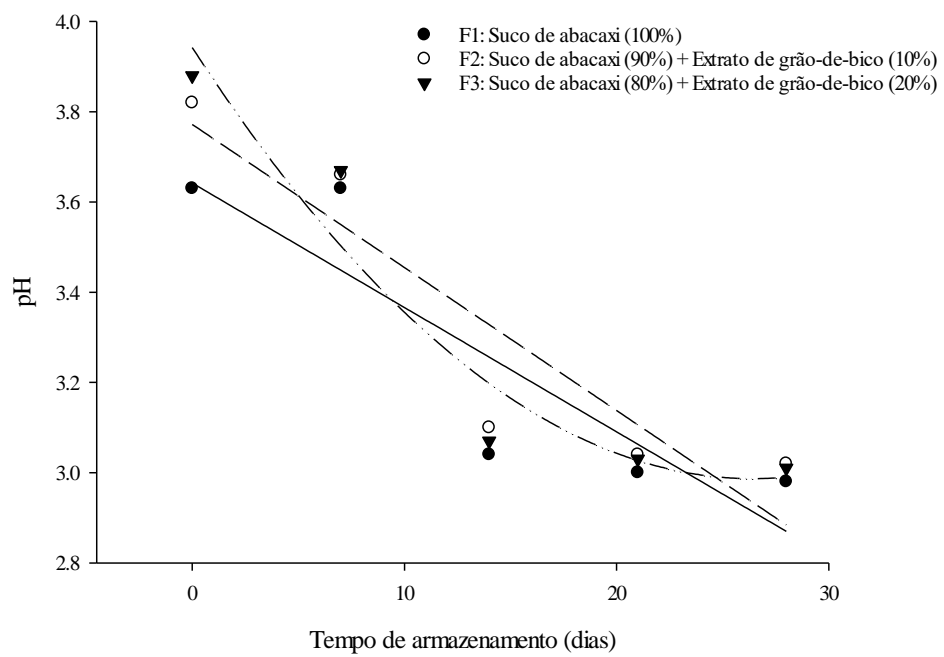
de grão-de-bico, obteve-se 0,48 % de fibra bruta, enquanto para F2 obteve-se 0,15 %. Esses dados confirmam que o extrato de grão-de-bico contribui com a maior parte do total de fibra bruta presente nas bebidas. No entanto, sabe-se que esse valor poderia ser ainda maior, considerando-se que na etapa de filtração do grão-de-bico cozido e processado, do suco de abacaxi e das bebidas em coador de voal houve retenção de uma boa parte de resíduo vegetal e, portanto, de fibra bruta.

Com relação aos valores médios de carboidratos, houve diferenças significativas ($p < 0,05$) entre o valor médio obtido para a formulação elaborada controle (F1) e a formulação com o maior teor de extrato de grão-de-bico (F3), assim como entre a formulação com 10 % de extrato de grão-de-bico (F2) e a formulação com 20 % de extrato (F3). Com a adição de extrato de grão-de-bico, que contém 3,39 % de carboidrato, diminuiu-se a proporção de carboidrato da bebida, haja vista que o suco de abacaxi (sem diluição em água) contém entre 12,1 % e 12,49 % (RINCON; BOTELHO; ALENCAR, 2020; ANSES, 2020; GHAFARI; ANSARI, 2018). Assim, quanto maior o volume de suco de abacaxi e menor o volume de extrato adicionado, maior foi o teor de carboidratos da bebida.

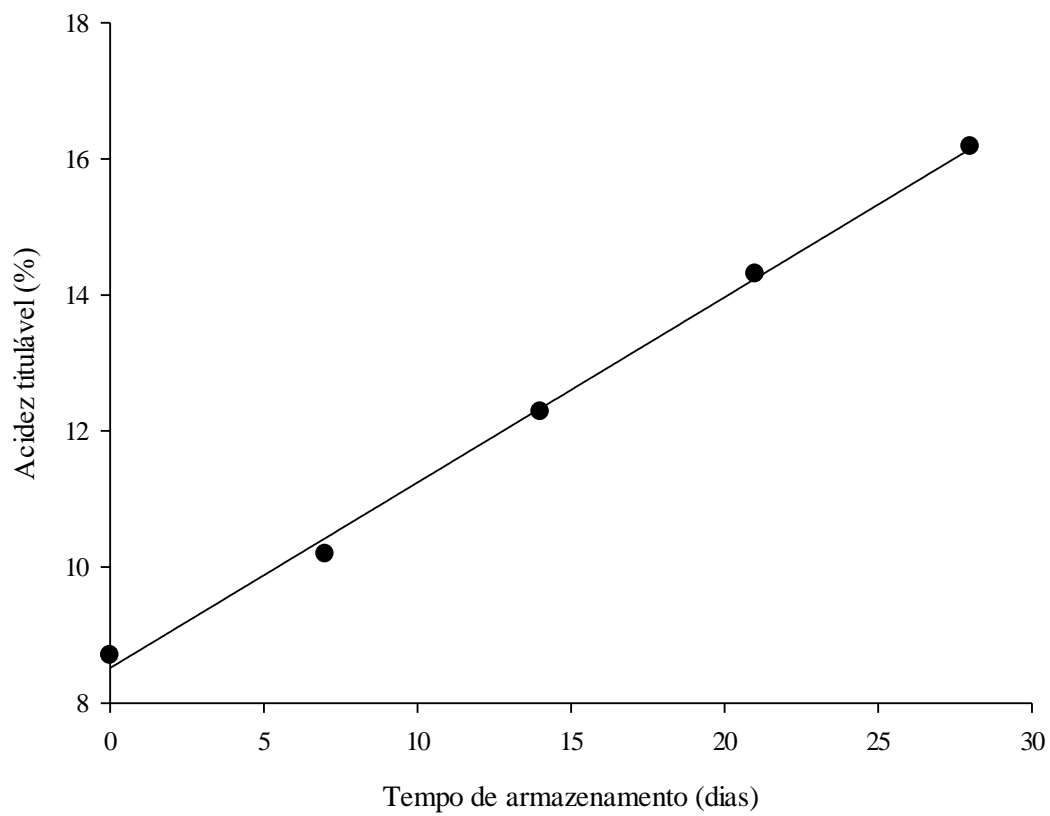
5.2. CARACTERIZAÇÃO DAS DIFERENTES FORMULAÇÕES DE BEBIDA DE SUCO DE ABACAXI E EXTRATO DE GRÃO-DE-BICO DURANTE ARMAZENAMENTO REFRIGERADO

As bebidas elaboradas com suco de abacaxi e extrato de grão-de-bico foram avaliadas quanto à variação do pH (Figura 1a), acidez titulável (Figura 1b) e sólidos solúveis (Figura 1c) durante 28 dias de armazenamento a 4 °C.

a)



b)



c)

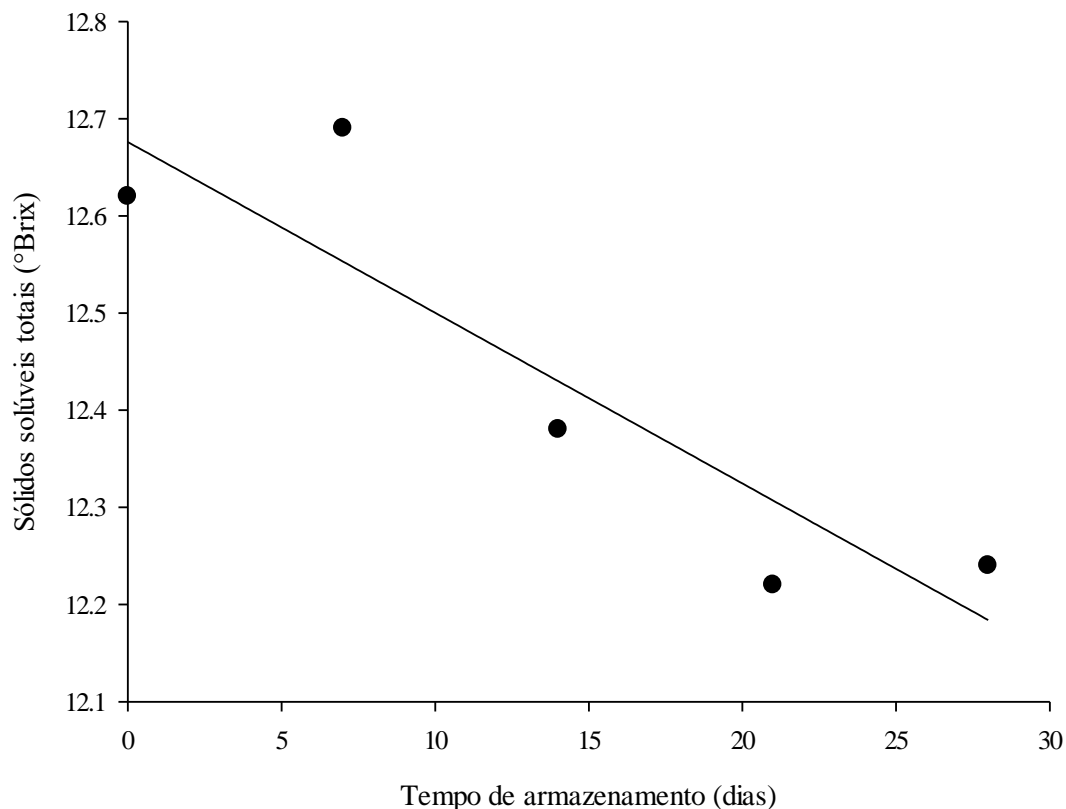


Figura 1 – Variação de pH, acidez titulável (g/100 g de ácido) e sólidos solúveis (°BRIX) em bebidas de suco de abacaxi e extrato de grão-de-bico suplementadas com concentrado de células de *Lactobacillus paracasei* subsp *paracasei* LBC 81 durante um período de estocagem de 28 dias a 4 °C.

5.2.1. pH

O pH de todas as formulações da bebida de suco de abacaxi e extrato de grão-de-bico sofreu declínio progressivo no decorrer do tempo de armazenamento de 28 dias a 4 °C, como mostrado na Figura 1a. O valor médio de pH da bebida controle (F1) no tempo inicial foi 3,6, com redução a 2,9 no 28° dia. Na formulação F2, o pH inicial foi 3,8 e, entre o 21° e o 28° dia, houve redução para 3,0. A formulação F3, com 20 % de extrato de grão-de-bico, apresentou pH inicial 3,9 e, entre o 14° e o 28° dia de estocagem, pH 3,0. Houve interação significativa ($p < 0,05$) entre os valores médios de pH das diferentes formulações com o tempo de estocagem. Quanto maior o tempo de estocagem, maior foi a redução de pH das bebidas.

Uma vez que o extrato de grão-de-bico tem pH 6,25, esperava-se que em função da adição de extrato às formulações F2 e F3 haveria manutenção da estabilidade do pH, sobretudo em relação à formulação controle (F1) (RINCON; BOTELHO; ALENCAR, 2020). No entanto, a Figura 1a demonstra que a tendência foi de declínio e os resultados finais foram similares para todas as bebidas.

O decréscimo observado foi devido à produção de ácidos orgânicos, entre os quais o ácido láctico, como produtos finais do metabolismo fermentativo da bactéria, que consome glicose e frutose do substrato para o seu crescimento (COSTA *et al.*, 2013; PALACHUM; CHORIT; CHISTI, 2021; MOUSAVI *et al.*, 2011). Outros estudos com bebidas à base de suco de abacaxi suplementadas com diferentes espécies de *Lactobacillus* e adicionadas de prebióticos apresentaram semelhante tendência de redução de pH (NGUYEN *et al.*, 2019; CAMPOS *et al.*, 2019; PALACHUM; CHORIT; CHISTI, 2021).

O decréscimo de pH nas bebidas F1 e F2 foi ajustado pelo modelo linear, sendo descrito pela equação de 1º grau (Figura 1a e Tabela 2), enquanto o decréscimo de pH da bebida F3 foi ajustado pelo modelo polinomial, sendo descrito pela equação de 2º grau (Figura 1a e Tabela 2).

Tabela 2 – Equações de regressão e valor r^2 de diferentes parâmetros (acidez titulável, pH, viabilidade e sólidos solúveis) de bebidas de suco de abacaxi e extrato de grão-de-bico durante 28 dias de armazenamento a 4 °C.

Variáveis	Formulações (F) ¹	Equações de regressão	r^2	EPE
Acidez titulável		$\hat{y} = 8.5160 - 0.2726x$	0.973	0.18
pH	F1	$\hat{y} = 3.6420 - 0.0276x$	0.7957	0.1785
	F2	$\hat{y} = 3.7720 - 0.0317x$	0.8467	0.1725
	F3	$\hat{y} = 3.9423 - 0.0724x + 0.0019x^2$	0.9284	0.1558
Viabilidade		$\hat{y} = 8.1591 + 0.0435x - 0.0012x^2$	0.8167	0,1096
Sólidos solúveis		$\hat{y} = 12.6760 - 0.00176x$	0.8116	0.1082

EPE: erro padrão da estimativa

5.2.2. ACIDEZ TITULÁVEL

A redução de pH das bebidas foi confirmada pelo aumento da acidez titulável (AT) ao longo do tempo de armazenamento (Figura 1b). Independentemente do tipo de formulação da bebida, o aumento da AT apresenta o comportamento linear que é

observado na Figura 1b. Os valores médios de AT foram aproximadamente 8 % no tempo 0, 10 % no 7º dia, 12 % no 14º dia, 14 % no 21º dia e 16 % no 28º dia. Não houve interação significativa ($p > 0,05$) da AT nas diferentes formulações da bebida com o tempo de armazenamento.

No estudo de Campos et al. (2019), o declínio de pH também acompanhou o aumento de AT na bebida de abacaxi com cultura de *L. rhamnosus* GG e o fator tempo de armazenamento não foi significativo ($p > 0,05$). Ghafari e Ansari (2018) também observaram que o pH de suas bebidas de suco de abacaxi acrescidas de sacarose, inulina e suplementadas com *L. casei* e *L. rhamnosus* reduziu significativamente ($p < 0,05$), com variação de acidez em relação ao tempo não significativa ($p > 0,05$).

5.2.3. SÓLIDOS SOLÚVEIS TOTAIS

O teor de sólidos solúveis é outra variável que apresentou decréscimo no decorrer do armazenamento das bebidas (Figura 1c). No tempo inicial (tempo 0), o valor médio de SST para as bebidas foi 12,6 °BRIX; no 7º dia, 12,7 °BRIX; no 14º dia, cerca de 12,3 °BRIX; no 21º dia, observou-se decréscimo para 12,2 °BRIX; e no 28º dia o valor de SST continuou em 12,2 °BRIX. De tal modo, não houve interação significativa ($p > 0,05$) entre o teor de sólidos solúveis nas diferentes formulações das bebidas com o tempo de armazenamento. Assim como no presente estudo, os achados de Ghafari e Ansari (2018) em bebidas de suco de abacaxi suplementadas com *L. casei*, *L. rhamnosus* e inulina foram de redução de pH e SST, porém houve interação significativa ($p < 0,05$) com o tempo de armazenamento.

O decréscimo de SST ocorreu em razão do consumo de carboidratos (entre os quais, açúcares disponíveis) e proteínas, como fonte de nitrogênio, por *L. paracasei* (HOSSAIN *et al.*, 2020; PALACHUM; CHOORIT; CHISTI, 2021). A redução de SST está associada à redução de pH e aumento de AT observados nas bebidas. O resultado obtido para SST foi ajustado pelo modelo linear que é descrito pela equação de 1º grau (Figura 1c e Tabela 2).

5.3. BOLORES E LEVEDURAS

As bebidas de abacaxi e extrato de grão-de-bico foram avaliadas quanto à presença de bolores e leveduras. Durante o período de armazenamento, observou-se baixa contaminação (2 a 4 colônias), sendo a maioria $< 1,0$ UFC/mL. Esse resultado demonstra

que com até 28 dias de armazenamento a bebida poderá ser consumida com segurança, quando for considerado o parâmetro microbiológico de bolores e leveduras.

5.4. SINÉRESE

Independentemente do tempo de armazenamento, as formulações das bebidas apresentaram diferenças significativas ($p < 0,05$) quanto à estabilidade física (Figura 2).

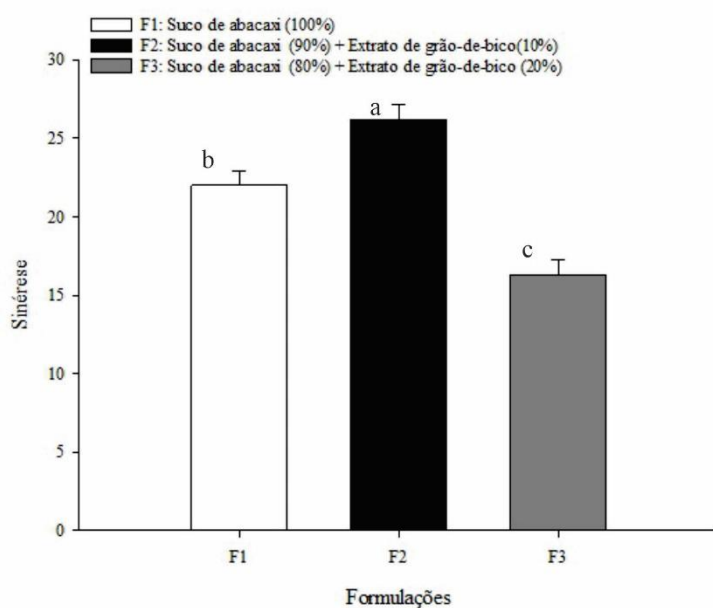


Figura 2 – Sinérese de bebidas de suco de abacaxi e extrato de grão-de-bico suplementadas com concentrado de *Lactobacillus paracasei* subsp *paracasei* LBC 81 independente do tempo de estocagem.

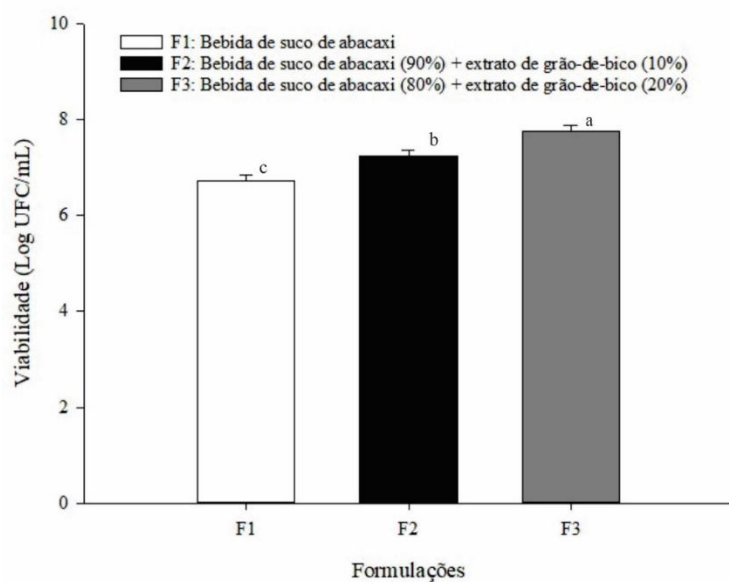
O valor médio de sinérese foi maior na bebida acrescida de 10 % de extrato de grão-de-bico (F2). A sinérese em bebidas elaboradas com suco de fruta pode ocorrer em função da presença de enzimas deteriorantes em sucos de frutas (peroxidase, polifenoloxidase e pectina-metilesterase), assim como pela interação entre proteína e pectina (JUKANTI, 2017; ISLAM *et al.*; 2021; SIEBERT, 1999). A separação de fases e a sedimentação no fundo do tubo ocorrem, também, em decorrência da produção de ácidos orgânicos e outros metabólitos do metabolismo fermentativo da bactéria (ISLAM *et al.*, 2021). Além disso, prolina (no suco de abacaxi e no grão-de-bico), proantocianidinas (no suco de abacaxi) e polissacarídeos também contribuem para essas modificações físicas observadas (SIEBERT, 1999). A interação entre amilose e amilopectina (do amido do grão-de-bico) e a retrogradação da amilopectina podem ter

ocorrido, sobretudo na formulação com sinérese estatisticamente superior (F2) aos resultados obtidos para as demais bebidas (F1 e F3) (PERERA; HOOVER, 1999; ISLAM *et al.*, 2021; WANG; CHELIKANI; SERVENTI, 2018; KARIM; NORZIAH; SEOW, 2000).

5.5. VIABILIDADE DE *Lactobacillus paracasei* subsp *paracasei* LBC 81 DURANTE ESTOCAGEM DE 28 DIAS A 4 °C

A sobrevivência de *L. paracasei* subsp *paracasei* LBC 81 nas diferentes formulações de bebida de suco de abacaxi e extrato de grão-de-bico durante 28 dias de armazenamento a 4 °C é apresentada na Figura 3.

a)



b)

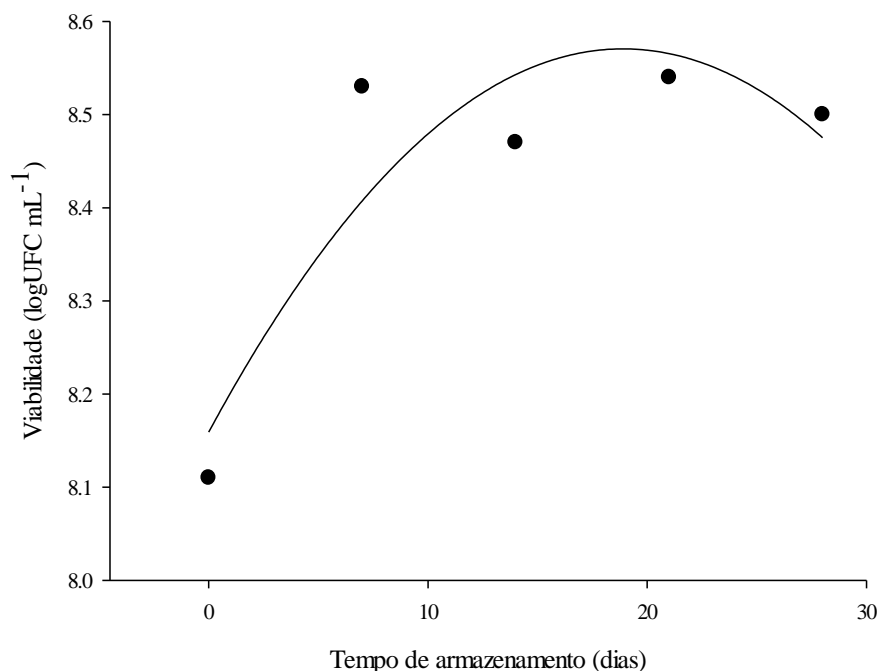


Figura 3 - Viabilidade de *Lactobacillus paracasei* subsp *paracasei* LBC 81 em formulações de bebida de suco de abacaxi e extrato de grão-de-bico durante estocagem de 28 dias a 4 °C.

Como a Figura 3a ilustra, independentemente do tempo de armazenamento a viabilidade de *L. paracasei* foi significativamente ($p < 0,05$) maior na formulação F3 (7 log UFC/mL) e significativamente ($p < 0,05$) menor na formulação F1 (6 log UFC/mL). Este resultado demonstra que a adição de extrato de grão-de-bico conferiu um papel protetor à estirpe, sobretudo na formulação com o maior percentual de extrato (F3).

O grão-de-bico é uma leguminosa rica em carboidratos e fibras com função prebiótica e proteínas, assim como em minerais (Ca, Fe, Mg, Mn, P e Zn) e aminoácidos livres (CORTÉS-GIRALDO *et al.*, 2016; DAI *et al.*, 2017; RACHWA-ROSIK; NESBENY; BUDRYN, 2015; BELL, 2003). No entanto, a formulação com 20 % de extrato de grão-de-bico (F3) apresentou o menor percentual de carboidratos. O valor médio de F3 foi significativamente ($p < 0,05$) menor que o valor obtido para F1 (controle). Esse resultado mostrou que os carboidratos não foram, portanto, o fator diferencial para a maior viabilidade de *L. paracasei* LBC 81 na bebida com 20 % de extrato de grão-de-bico (F3).

Por outro lado, considerando-se que o percentual de proteína no extrato de grão-de-bico é 2,1 % (RINCON; BOTELHO; ALENCAR, 2020), enquanto no suco de abacaxi é cerca de 0,43 % (GHAFARI; ANSARI, 2018), é possível que a presença de aminoácidos do grão-de-bico, entre os quais a arginina, tenha sido favorável à sobrevivência de *L.*

paracasei, por serem essenciais para sua atividade metabólica e defesa frente às condições de estresse ácido e baixa temperatura (WANG; CUI; QU, 2018; MARTINEZ-VILLALUENGA *et al.*, 2006; SIDHU *et al.*, 2020; HUSSEIN *et al.*, 2020; SAARELA *et al.*, 2006; DONKOR *et al.*, 2007; NUALKAEKUL; DEEPIKA; CHARALAMPOPOULOS, 2012; PIMENTEL *et al.*, 2015).

Segundo Papadimitriou *et al.* (2016), o metabolismo de aminoácidos livres é crucial para a resistência ao estresse em bactérias lácticas. Esses mesmos autores afirmam que a desaminação e a descarboxilação de aminoácidos livres estão entre as principais rotas para de proteção cruzada favoráveis ao crescimento e sobrevivência de BALs em condições de estresse. BALs com potencial probiótico podem tolerar acidez neutralizando seu citoplasma através de vias de descarboxilação ou desaminação de aminoácidos disponíveis no meio (WANG; CHELIKANI; SERVENTI, 2018). Por meio dessas vias, o acúmulo de aminoácidos intracelular aumenta o pH do citoplasma e a célula consegue se manter protegida. A arginina desaminase, enzima chave no metabolismo de aminoácidos para o controle do pH citoplasmático, converte a arginina a ornitina, que é utilizada para a produção de ATP, dióxido de carbono e amônia. A amônia é uma substância alcalina que neutraliza ácidos (WANG; CHELIKANI; SERVENTI, 2018; WANG; CUI; QU, 2018; WU *et al.*, 2012). A glutamato descarboxilase, outra enzima chave expressas pelas BALs, é responsável pela conversão de glutamato a γ -aminobutirato, que também aumenta o pH intracelular em estresse ácido (WANG; CUI; QU, 2018).

O percentual de fibra bruta obtido para a formulação com 20 % de extrato de grão-de-bico foi significativamente ($p < 0,05$) maior que os percentuais de F1 e F2, sendo compatível com a maior viabilidade de *L. paracasei* em F3. Esse resultado indica que a adição de 20 % de extrato de grão-de-bico pode ter contribuído com mais fibras prebióticas quando comparado às bebidas F1 e F2, podendo ter conferido proteção adicional às células em condições de baixo pH e temperatura (SAARELA *et al.*, 2006). A suplementação de bebidas à base de suco de fruta com fibras prebióticas como β -glucana, inulina e FOS tem demonstrado manter a viabilidade e estabilidade de estirpes probióticas nesses produtos (SAARELA *et al.*, GHAFARI; ANSARI, 2018; PIMENTEL *et al.*, 2015). Na Figura 3b, em que a viabilidade de *L. paracasei* é observada em relação ao tempo de armazenamento, é possível observar que a contagem aumentou do tempo inicial ao 7º dia (8,1 log UFC/mL a 8,5 log UFC/mL) e sofreu discreta redução no 14º dia (8,4 log UFC/mL), seguida de discreto aumento no 21º dia (8,5 log UFC/mL) e um ligeiro decréscimo no 28º dia (aproximadamente 8,5 log UFC/mL). O aumento da viabilidade de

L. paracasei seguido de decréscimo independentemente do tipo de bebida corresponde a um modelo polinomial ajustado pela equação de 2º grau (Figura 3b e Tabela 3).

Tabela 3 – Equações de regressão e valor r^2 de diferentes parâmetros (acidez titulável, pH, viabilidade e sólidos solúveis) de bebidas de suco de abacaxi e extrato de grão-de-bico durante 28 dias de armazenamento a 4 °C.

Variáveis	Formulações (F) ¹	Equações de regressão	r^2	EER
Acidez titulável		$\hat{y} = 8.5160 - 0.2726x$	0.973	0.18
pH	F1	$\hat{y} = 3.6420 - 0.0276x$	0.7957	0.1785
	F2	$\hat{y} = 3.7720 - 0.0317x$	0.8467	0.1725
	F3	$\hat{y} = 3.9423 - 0.0724x + 0.0019x^2$	0.9284	0.1558
Viabilidade		$\hat{y} = 8.1591 + 0.0435x - 0.0012x^2$	0.8167	0,1096
Sólidos solúveis		$\hat{y} = 12.6760 - 0.00176x$	0.8116	0.1082

EPE: Erro Padrão da Estimativa

Assim como neste estudo, no estudo de Fonseca (2022) com suco de maracujá fermentado com cultura mista de *Lactiplantibacillus plantarum* CCMA 0743 e *Lacticaseibacillus L. paracasei* LBC 81, a viabilidade observada durante estocagem por 28 dias a 4 °C também foi acima de 8 log UFC/mL, mesmo com redução de pH a um valor de 3,51. A variação nas contagens de células viáveis no presente estudo difere do que se observou no estudo de Ghafari e Ansari (2018) com bebidas de suco de abacaxi suplementadas com *L. rhamnosus* e *L. casei* e adicionadas de inulina, em que a tendência observada foi de redução durante os 28 dias de armazenamento a 4 °C, resultando em uma viabilidade entre 4,53 e 6,45 log UFC/mL, inferior aos valores obtidos para a bebida de suco de abacaxi e extrato de grão-de-bico (GHAFARI; ANSARI, 2018). Por outro lado, de modo semelhante ao que se observou neste estudo em relação ao comportamento de *L. paracasei* LBC 81, em bebidas de extratos de grão-de-bico e coco adicionadas de diferentes teores de açúcar e fermentadas, a tendência também foi, independentemente da formulação, de crescimento da população dessa estirpe ao longo do tempo de armazenamento (MESQUITA *et al.*, 2020). A viabilidade final, independentemente do tempo, ultrapassou 8,0 log UFC/mL, próximo ao valor médio obtido para as bebidas de suco de abacaxi e extrato de grão-de-bico. Outra semelhança entre o presente estudo e o estudo de Mesquita *et al.* (2020) é o decréscimo de pH e SST e o aumento de AT e como isso não afetou a viabilidade final (MESQUITA *et al.*, 2020). Certamente, os compostos

nitrogenados presentes no extrato de grão-de-bico em ambas as bebidas contribuíram para esses resultados de viabilidade. Segundo Nualkaekul, Salmeron e Charalampopoulos (2011), a concentração mínima de proteína sugerida para manter a viabilidade probiótica é 0,3 %. Baixo percentual de proteína (0,04 %) foi associado a redução na viabilidade de *L. paracasei* subsp *paracasei* em suco de maçã adicionado de oligofrutose e armazenado nas mesmas condições que as bebidas de suco de abacaxi e extrato de grão-de-bico (PIMENTEL *et al.*, 2015).

O aumento da viabilidade de *L. paracasei* no início do armazenamento (Figura 3b) demonstra que todas as bebidas formuladas podem ser consideradas excelentes substratos para essa estirpe. Contudo, no final do armazenamento houve um pequeno decréscimo da viabilidade de *L. paracasei*. Esse comportamento é esperado, visto que no final do armazenamento a bactéria pode sofrer danos fisiológicos decorrentes de baixas temperaturas, que lentificam reações químicas e inibem o crescimento bacteriano, e os próprios metabólitos gerados pela cultura podem estar associados à redução da viabilidade (VOGADO *et al.*, 2018). Somado a isso, as BALs são anaeróbias e aerotolerantes, e algumas cepas de *Lactobacillus* suportam uma concentração de até 21 % de oxigênio. Essas bactérias são desprovidas de catalase e não sintetizam componentes da cadeia de transporte de elétrons. Assim, o substrato é utilizado para produzir adenosina trifosfato (ATP) pelo metabolismo fermentativo e sofre reações de oxidação e redução mediadas por NADH, cuja oxidação envolve a redução de oxigênio molecular via NADH oxidase (TALWALKAR; KAILASAPATHY, 2004). Todavia, esse processo pode resultar em redução incompleta de oxigênio molecular e gerar espécies reativas de oxigênio que se difundem através da membrana da célula do micro-organismo. O acúmulo desses metabólitos tóxicos causa danos oxidativos e consequente morte celular (BOZAMENDÉZ *et al.*, 2012; HIGUCHI; YAMAMOTO; KAMIO, 2000). Além disso, com a redução do pH, mais energia na forma de ATP o micro-organismo precisa consumir para manter um pH de homeostase entre os ambientes extracelular e intracelular. Esse equilíbrio é possível com a ação da ATPase, que hidrolisa ATP para gerar a energia que o transporte de prótons do citoplasma para o exterior da célula precisa (CORCORAN *et al.*, 2005).

Assim, o esgotamento de substrato energético e as injúrias do ambiente ácido à parede celular da bactéria deixam-na suscetível à redução na viabilidade (NUALKAEKUL; CHARALAMPOPOULOS, 2011). É importante ressaltar que o decréscimo de viabilidade observado foi inferior a 1 log UFC/mL e não comprometeu a funcionalidade da bebida, pois a contagem da estirpe permaneceu acima do limite mínimo

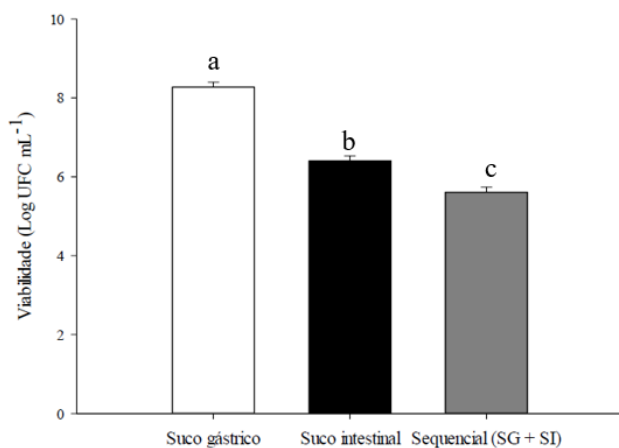
estabelecido para uma bebida ser considerada probiótica (WGO, 2017; GROM *et al.*; 2020; RANADHEERA *et al.*, 2019; HILL *et al.*; 2014).

Assim como neste estudo, em que a adição de extrato de grão-de-bico acentuou a sobrevivência de *L. paracasei* LBC 81 em suco de abacaxi, outros estudos também têm demonstrado que o suco de abacaxi quando suplementado pode acentuar a viabilidade de estirpes probióticas (NGUYEN *et al.*, 2019; ISLAM *et al.*, 2021; GHAFARI; ANSARI, 2018; PALACHUM; CHORIT; CHIST, 2021). Ghafari e Ansari (2018) observaram que em suco de abacaxi suplementado com *Lactobacillus casei* (ATCC 39392) e *Lactobacillus rhamnosus* (ATCC 1637) a adição de inulina proporcionou aumento significativo ($p < 0,05$) na viabilidade destas estirpes em 28 dias de armazenamento a 4 °C. Outros autores mostraram que em suco de abacaxi fermentado com *L. acidophilus* LA-5 a adição de soro de coalhada não comprometeu a viabilidade da estirpe em 28 dias a 4 °C (ISLAM *et al.*, 2021). Palachum, Choorit e Chist (2021) também demonstraram que, quando suplementado, o suco de abacaxi é um bom substrato para o crescimento de *Lactobacillus*. Após 21 dias de armazenamento a 4 °C, o suco de abacaxi fermentado com extrato de malte apresentou viabilidade de *L. plantarum* WU-P19 entre 5,8 e 5,9 log UFC/mL, enquanto na bebida controle (sem extrato de malte) a viabilidade foi aproximadamente 5,6 log UFC/mL. Independentemente da suplementação com extrato de malte, todas as bebidas apresentaram contagens de células viáveis acima de 10^{11} em 100 mL do produto.

5.6. VIABILIDADE DE *Lactobacillus paracasei* subsp *paracasei* LBC 81 APÓS EXPOSIÇÃO AOS SUCOS GÁSTRICO E INTESTINAL

A viabilidade de *L. paracasei* nas diferentes formulações da bebida após exposição ao suco gástrico, intestinal e exposição sucessiva aos sucos gástrico e intestinal é apresentada na Figura 4.

a)



b)

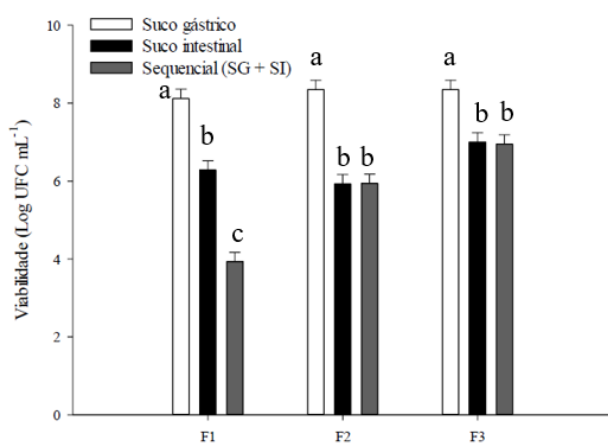


Figura 4 – Viabilidade de *Lactobacillus paracasei* subsp *paracasei* LBC 81 adicionada às bebidas de suco de abacaxi e extrato de grão-de-bico após exposição a condições do trato gastrointestinal *in vitro*.

Independentemente do tipo de formulação da bebida, a viabilidade de *L. paracasei* foi significativamente ($p < 0,05$) maior após exposição ao suco gástrico, com viabilidade superior a 8 log UFC/mL (Figura 4a). O segundo maior valor médio obtido para viabilidade foi após exposição ao suco intestinal, aproximadamente 6 log UFC/mL (Figura 4a), enquanto a menor viabilidade foi após a exposição sucessiva aos sucos gástrico e intestinal, cerca de 5 log UFC/mL (Figura 4a).

A viabilidade dessa estirpe também foi maior após exposição ao suco gástrico quando presente em bebida elaborada com extratos de grão-de-bico e coco. A taxa de

sobrevivência foi 99,47 % na bebida fermentada, sendo significativamente ($p < 0,05$) maior do que na bebida suplementada com *L. paracasei* LBC 81, em que a taxa de sobrevivência foi a segunda maior, aproximadamente 90 % (MESQUITA *et al.*, 2021). Outros estudos também demonstraram que *L. paracasei* em substratos diversos pode sobreviver mediante exposição ácida, como em leite fermentado enriquecido ou não enriquecido com biomassa de banana verde, refrigerado ou congelado, onde se alcançou valores finais de viabilidade entre 7 e 8 log UFC/mL (VOGADO *et al.*, 2019; CAVALCANTI *et al.*, 2019).

Tais resultados demonstram que essa estirpe pode apresentar uma tolerância intrínseca ao ambiente ácido ou capacidade de se adaptar a este meio, pois uma vez exposta a esta e outras condições de estresse celular a bactéria pode sofrer alterações na expressão de genes envolvidos em mecanismos de adaptação (VAN DE GUCHTE *et al.*, 2002). Expulsão de prótons, descarboxilação de aminoácidos e indução de proteínas de choque ácido são outros mecanismos de resposta ao processo de adaptação da cepa às condições adversas que se apresentam à sua sobrevivência, todos em função de conferir proteção celular contra injúrias letais próprias do estresse ácido (VAN DE GUCHTE *et al.*, 2002).

No suco de abacaxi, *L. paracasei* LBC 81 pode ter se adaptado ao ambiente ácido e ativado mecanismos de resistência que a protegeram de condições ácidas mais letais. Vários mecanismos de defesa ao ambiente ácido já foram constatados em bactérias lácticas (VAN DE GUCHTE *et al.*, 2002; SANCHEZ *et al.*, 2008; SIDHU *et al.*, 2020; WANG; CHELIKANI; SERVENTI, 2018).

Alguns estudos com suco de abacaxi com e sem prebiótico suplementados com diferentes espécies de *Lactobacillus* têm demonstrado sua sobrevivência ao estresse gástrico e intestinal simulado *in vitro* (NGUYEN *et al.* 2019; CAMPOS *et al.*, 2019). *L. plantarum* 299V e *L. acidophilus* La5 tiveram maior redução de viabilidade quando expostos ao estresse gástrico, diferente do resultado obtido no estudo de Campos *et al.* (2019), com bebida mista de juçara e abacaxi, em que se observou maior redução na viabilidade de *L. rhamnosus* GG após as fases entéricas.

Com a exposição ao suco intestinal, as contagens totais de F1, F2 e F3 foram, respectivamente, 6 log UFC/mL, 5 log UFC/mL e 7 log UFC/mL, sem diferenças significativas ($p > 0,05$) entre os diferentes tratamentos em relação ao tipo de exposição. A maior sensibilidade de *L. paracasei* ao suco intestinal pode estar associada à presença de sais biliares. Os sais biliares são considerados altamente tóxicos aos micro-organismos e as membranas bacterianas são seus principais alvos de ação (BUSTOS *et al.*, 2018).

Esses mesmos autores afirmam que a tolerância aos sais biliares é dependente da cepa e apresenta extrema variabilidade ainda que dentro do mesmo gênero ou espécie.

A exposição ao suco gástrico seguida da exposição ao suco intestinal demonstrou ser a condição mais letal para *L. paracasei* LBC 81 na formulação controle (F1). A viabilidade de *L. paracasei* em F1 sofreu redução estatisticamente significativa ($p < 0,05$) de 8 log UFC/mL (após exposição ao suco gástrico) para menos que 4 log UFC/mL, após a exposição aos dois sucos digestivos. No estudo de Vogado et al. (2019), também se observou alto percentual de redução da viabilidade de *L. paracasei* LBC 81 quando exposta aos sucos gástrico e intestinal de forma sequencial. Esse decréscimo na viabilidade após exposição ao duodeno e ao íleo também foi observado em ensaio de digestão simulada de Fonseca (2022) com cultura mista de *Lactocaseibacillus L. paracasei* LBC 81 e *Lactiplantibacillus L. plantarum* CCMA 0743 em suco de maracujá fermentado. Mesmo com a exposição ao pH 2,0 da pepsina (esôfago e estômago), a viabilidade da cultura foi 7,18 log UFC/mL, enquanto os valores médios obtidos após passagem pelo duodeno (pancreatina e sais biliares, pH 5,0, 30 minutos) e íleo (pH 6,5, 60 minutos) foram 5,83 e 5,77 log UFC/mL, respectivamente.

Neste estudo, diferentemente do que ocorreu com a viabilidade de *L. paracasei* na formulação controle (F1), a adição de extrato de grão-de-bico à bebida acentuou significativamente ($p < 0,05$) a viabilidade após exposição sucessiva aos sucos gástrico e intestinal (Figura 4b). Na bebida controle, a viabilidade de *L. paracasei* LBC 81 após exposição sequencial aos sucos gástrico e intestinal foi significativamente ($p < 0,05$) menor em relação à exposição ao suco intestinal, 6 log UFC/mL. As formulações com extrato de grão-de-bico (F2 e F3) demonstraram ser as mais protetoras com relação à estirpe (Figura 4b), com viabilidade após a exposição sequencial significativamente ($p < 0,05$) maior nas formulações com extrato de grão-de-bico (F2 e F3). Embora a bebida F3 tenha apresentado viabilidade maior (8 log UFC/mL) que o observado para a bebida F2, não houve diferença estatística entre os resultados de viabilidade. Com a exposição ao suco gástrico, a pepsina pode desfazer a ligação peptídica entre aminoácidos, degradar a membrana celular dos micro-organismos e causar danos que os tornam mais suscetíveis ao poder letal da ação dos sais biliares na exposição ao suco intestinal, pois facilita efeitos como estresse osmótico, acidificação intracelular e outros efeitos dos sais no citoplasma da célula bacteriana que comprometem mais a viabilidade do micro-organismo (CHAMPAGNE; GARDER, 2008; BEGLEY; GAHAN; HILL, 2005; THANASSI; CHENG; NIKAIDO, 1997). Ácidos biliares e enzimas digestivas (lipases, proteases e

amilases) têm ação de ruptura da membrana celular da bactéria, podendo assim prejudicar sua viabilidade (YAO *et al.*, 2018; YAO *et al.*, 2020).

Com a adição de extrato de grão-de-bico às formulações F2 e F3, a viabilidade de *L. paracasei* ao estresse sequencial passou a não apresentar diferença significativa ($p > 0,05$) em relação à exposição ao suco intestinal. Para a formulação F2, com 90% de suco de abacaxi e 10% de extrato de grão-de-bico, obteve-se aproximadamente 5 log UFC/mL tanto após exposto ao suco intestinal como após a exposição sequencial. Para a formulação F3, com 80% de suco de abacaxi e 20% de extrato de grão-de-bico, obteve-se um valor médio superior ao de F2, cerca de 7 log UFC/mL, porém sem diferença estatística.

Essa proteção conferida durante o estresse sequencial pode ter relação com a composição química do grão-de-bico, especialmente aminoácidos e micronutrientes (minerais e vitaminas), considerando-se que os percentuais de proteínas foram significativamente maiores ($p < 0,05$) em F2 e F3 e o percentual de cinzas foi significativamente ($p < 0,05$) maior em F3. Aminoácidos são utilizados no metabolismo das BALs para a manutenção de funções vitais, atividade metabólica, crescimento microbiano e resistência às condições de estresse (WANG; CUI; QU, 2018). Valina, leucina, isoleucina, arginina e prolina são alguns dos aminoácidos que são acumulados no interior do citoplasma das BALs como resposta ao estresse (WANG; CUI; QU, 2018). Para a defesa de *L. paracasei* em condições letais, aminoácidos do grão-de-bico, como arginina e glutamato, podem ter sido, respectivamente, desaminado e descarboxilado pelas BALs para o seu acúmulo intracelular, um mecanismo que aumenta o pH citoplasmático, neste caso com vistas a resistir à ação surfactante e deletéria de dos sais biliares (VAN DE GUCHTE *et al.*, 2002; DE ANGELIS; GOBBETTI, 2004; FIOCCO *et al.*, 2020; CASAROTTI; PENNA, 2015; CORTÉS-GIRALDO *et al.*, 2016; WANG; CHELIKANI; SERVENTI, 2018). O consumo de arginina pela via da arginina desaminase também gera energia na forma de ATP para a manutenção desse sistema de proteção das BALs. As fibras, encontradas em percentuais significativamente ($p < 0,05$) maiores nas bebidas F2 e F3, podem ter contribuído para a maior viabilidade de *L. paracasei* nestas formulações devido à sua função prebiótica e capacidade de imobilização física da bactéria (referência). Além disso, os exopolissacarídeos da parede celular das BALs têm sua produção aumentada em condições ácidas e formam barreira física contra a ação de sais biliares, ácido e estresse osmótico, o que melhora a resposta do micro-organismo aos fatores agressores (BOKE; ASLIM; AVCI, 2010; URIOT *et al.*, 2017; ALP; ASLIM, 2010; CAGGIANIELLO; KLEEREBEZEM; SPANO, 2016).

6. CONCLUSÃO

As bebidas de suco de abacaxi e extrato de grão-de-bico demonstraram-se substratos adequados para a incorporação de *L. paracasei* LBC 81. A adição de extrato de grão-de-bico aumentou os teores de proteínas, fibra bruta e resíduo mineral das bebidas. A viabilidade da estirpe não foi comprometida pela adição do extrato de grão-de-bico, apresentando uma população de *L. paracasei* superior ao mínimo recomendado para um produto ser considerado probiótico. As formulações, incluindo a formulação sem adição de extrato de grão-de-bico, apresentaram redução de pH e aumento da acidez titulável durante os 28 dias de armazenamento. Além disso, as formulações elaboradas com extrato de grão-de-bico acentuaram a sobrevivência de *L. paracasei* LBC 81 após exposição sequencial aos sucos gástrico e intestinal. A bebida F3, em termos de proteínas, resíduo mineral e fibra bruta, sobressaiu-se à bebida F2, contudo não foi o suficiente para que demonstrasse diferenças significativas ($p < 0,05$) quanto à viabilidade em estocagem e após digestão sequencial *in vitro*. Assim, ambas as formulações apresentaram os resultados esperados com o acréscimo de extrato. O extrato de grão-de-bico pode ser utilizado como prebiótico e protetor da estirpe *L. paracasei* LBC 81 em suco de abacaxi, sem ter influência em características físico-químicas como pH, acidez titulável e sólidos solúveis totais, assim como na estabilidade do produto a 4 °C, temperatura que está dentro da faixa recomendada para produtos probióticos (MORTAZAVIAN *et al.*, 2007; TRIPATHI; GIRI, 2014). Portanto, a bebida de suco de abacaxi e extrato de grão-de-bico demonstrou excelente aptidão como matriz carreadora para a estirpe *L. paracasei* LBC 81. Assim, esta bebida pode ser uma alternativa de bebida probiótica exclusivamente vegetal e à base de suco de fruta. Para verificação da aceitabilidade da bebida, a análise sensorial deve ser realizada.

7. REFERÊNCIAS

AFZAAL, M. *et al.* Survival and stability of free and encapsulated probiotic bacteria under simulated gastrointestinal conditions and in pasteurized grape juice. **Journal of Food Processing and Preservation**, v. 44, n. 3, p. 1–8, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1111/jfpp.14346>.

AGENCE NATIONALE DE SÉCURITÉ SANITAIRE, ALIMENTATION, ENVIRONNEMENT, TRAVAIL (ANSES). **Ciqual French food composition table**, 2020. Disponível em: <https://ciqual.anses.fr/#>.

ALP, G.; ASLIM, B. Relationship between the resistance to bile salts and low pH with exopolysaccharide (EPS) production of *Bifidobacterium* spp. isolated from infants feces and breast milk. **Anaerobe**, v. 16, p. 101–105, 2010. Disponível em: doi: 10.1016/j.anaerobe.2009.06.006.

ALTERMANN, E. *et al.* Complete genome sequence of the probiotic lactic acid bacterium *Lactobacillus acidophilus* NCFM. **Proceedings of the National Academy of Sciences (Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America)**, v. 102, n. 11, p. 3906-3912, 2005. Disponível em: <https://doi.org/10.1073/pnas.0409188102>.

AMERICAN OIL CHEMISTS' SOCIETY (AOCS). **Approved Procedure Am 5-04 - Rapid Determination of Oil/Fat Utilizing High Temperature Solvent Extraction**. 2005. Disponível em: <http://www.academia.edu/30938058/AOCS>.

ANEJA, K. R. *et al.* Microbes associated with freshly prepared juices of citrus and carrots. **International Journal of Food Sciences**, 2014. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1155/2014/408085>. PMID:26904628.

ANTUNES, A. E. C. *et al.* Acerola nectar with added microencapsulation probiotic. **Food Science and Technology**, v. 54, p. 125-131, 2013. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2013.04.018>.

AROOJ, A. *et al.* Technological, Processing and Nutritional Aspects of Chickpea (*Cicer arietinum*). **Saudi Journal of Pathology and Microbiology**, v. 109, p. 448-463, 2021. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.36348/sjpm.2021.v06i04.006>.

ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS (AOAC). HORWITZ, W.; LATIMER, G. W. (Org.). AOAC Official Method 932.12. **Official Methods of Analysis of the AOAC**. 18. ed. Gaithersburg, Maryland, USA: AOAC International, 2005.

ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS (AOAC). HORWITZ, W.; LATIMER, G. W. (Org.). AOAC Official Method 945.45. **Official Methods of Analysis of the AOAC**. 18. ed. Gaithersburg, Maryland, USA: AOAC International, 2005.

ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS (AOAC). HORWITZ, W.; LATIMER, G. W. (Org.). AOAC Official Method 991.22. **Official Methods of Analysis of the AOAC**. 18. ed. Gaithersburg, Maryland, USA: AOAC International, 2005.

ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS (AOAC). HORWITZ, W.; LATIMER, G. W. (Org.). AOAC Official Method 986.25. **Official Methods of Analysis of the AOAC**. 18. ed. Gaithersburg, Maryland, USA: AOAC International, 2005.

ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS (AOAC). AOAC Official Method 978.10, Fiber (Crude) in Animal Feed and Pet Food. *In*: HORWITZ, W.; LATIMER, G. W. (Org.). **Official Methods of Analysis of the AOAC International**. Gaithersburg, Maryland, USA: AOAC International, 2005. p. 46-47, 18 ed., cap. 4.

AXELSSON, L. Lactic Acid Bacteria: Classification and Physiology. *In*: SALMINEN, S.; WRIGHT, A. V.; OUWEHAND, A. (ed.). **Lactic Acid Bacteria: Microbiological and Functional Aspects**. 3. ed. New York, EUA: Marcel Dekker, Inc./CRC Press, 2004. p. 1-67. Disponível em: <https://doi.org/10.1201/9780824752033.ch1>.

BATES, R. P.; MORRIS, J. R.; CRANDALL, P. G. **Principles and practices of small - and medium - scale fruit juice processing**. Roma: Food and Agriculture Organization (FAO), 2001. ISBN 92-5-104661-1. Disponível em: <https://www.fao.org/3/y2515e/y2515e00.htm>.

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. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodres.2012.10.004>.

BELL, E. A. Nonprotein amino acids of plants: Significance in medicine, nutrition, and agriculture. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 51, n. 10, p. 2854-2865, 2003.

BEGLEY, M.; GAHAN, C. G. M.; HILL, C. The interaction between bacteria and bile. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 29, n. 4, p. 625-651, 2005. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.femsre.2004.09.003>.

BENTLEY, R.; MEGANATHAN, R. Biosynthesis of vitamin K (menaquinone) in bacteria. **Microbiological Reviews**, v. 46, n. 3, p. 241–280, 1982. Disponível em: <https://doi.org/10.1128/mr.46.3.241-280.1982>.

BEUCHAT, L. R.; COUSIN, M. A. Yeasts and Molds. *In*: DOWNES, F. P.; ITO, K (ed.). **Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods**. 4ª edição. Washington, DC, EUA: American Public Health Association, 2001.

BOKE, H; ASLIM, B.; AVCI, G. A. The role of resistance to bile salts and acid tolerance of exopolysaccharides (EPSs) produced by yogurt starter bacteria. **Archives of Biological Sciences**, v. 62, n. 2, p. 323–328, 2010. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.2298/ABS1002323B>.

BOZA-MENDÉZ, E.; LÓPEZ-CALVO, R.; CORTÉZ-MUÑOZ, M. Innovative dairy products development using probiotics: challenges and limitations. *In*: RIGOBELLO, E. C. (ed.). **Probiotics**. InTech, 2012. Capítulo 10. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.5772/50104>.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Agrofit**. 2012. Disponível em: http://agrofit.agricultura.gov.br/agrofit_cons/principal_agrofit_cons.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Resolução RDC nº 241, de 26 de julho de 2018**. Dispõe sobre os requisitos para comprovação da segurança e dos benefícios à saúde dos probióticos para uso em alimentos. Brasília: Agência Nacional de Vigilância Sanitária, [2018]. Disponível em: https://bvsms.saude.gov.br/bvs/saudelegis/anvisa/2018/rdc0241_26_07_2018.pdf.

BRUNO, L. M. *et al.* Non-dairy cashew nut milk as a matrix to deliver probiotic bacteria. **Food Science and Technology International**, v. 40, n. 3, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1590/fst.14219>.

BURITI, F. C. A.; CASTRO, I. A.; SAAD, S. M. I. Viability of *Lactobacillus acidophilus* in synbiotic guava mousses and its survival under *in vitro* simulated gastrointestinal conditions. **International Journal of Food Microbiology**, v. 137, n. 2-3 p. 121-129, 2010. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2009.11.030>.

BUSTOS, A. Y. *et al.* New insights into bacterial bile resistance mechanisms: the role of bile salt hydrolase and its impact on human health. **Food Research International**, v. 112, p. 250-262, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2018.06.035>. Disponível em: <https://doi.org/10.1021/jf020880w>.

CAGGIANIELLO, G.; KLEEREBEZEM, M.; SPANO, G. Exopolysaccharides produced by lactic acid bacteria: from health-promoting benefits to stress tolerance mechanisms. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 100, p. 3877–3886, 2016. Disponível em: doi: 10.1007/s00253-016-7471-2.

CALABUIG-JIMÉNEZ, L. *et al.* High pressures homogenization (HPH) to microencapsulate *L. salivarius* spp. *salivarius* in mandarin juice. Probiotic survival and *in vitro* digestion. **Journal of Food Engineering**, v. 240, p. 43–48, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2018.07.012>.

CAMPOS, R. C. de A. B. *et al.* *In vitro* and *in vivo* resistance of *Lactobacillus rhamnosus* GG carried by a mixed pineapple (*Ananas comosus* L. Merril) and jussara (*Euterpe edulis* Martius) juice to the gastrointestinal tract. **Food Research International**, v. 116, p. 1247–1257, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2018.10.012>.

CANTELLI, K.C. *et al.* Sprouts of genetic soybean lines: evaluation of chemical-physical properties. **Brazilian Journal of Food Technology**, v. 20, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1590/1981-6723.7416>.

CASAROTTI, S. N.; PENNA, A. L. B. Acidification profile, probiotic *in vitro* gastrointestinal tolerance and viability in fermented milk with fruit flours. **International Dairy Journal**, v. 41, p. 1-6, 2015. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2014.08.021>.

CAVALCANTI, M. H. *et al.* Production of frozen probiotic fermented milk enriched with green banana biomass: The effects of freezing, acid stress conditions and bile salts on *Lactobacillus paracasei* subsp *paracasei* LBC 81 viability. **Journal of Food Processing and Preservation**, v. 44, n. 2, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1111/jfpp.14318>.

CEAGESP. Companhia de Entrepósitos e Armazéns Gerais de São Paulo. 2013. Disponível em: <http://www.ceagesp.gov.br>.

CHALUPA-KREBZDAK, S.; LONG, C. J.; BOHRER, B. M. Nutrient density and nutritional value of milk and plant-based milk alternatives. **International Dairy Journal**, v. 87, p. 84–92, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2018.07.018>.

CHAMPAGNE, C. P.; GARDER, N. J. Effect of storage in a fruit drink on subsequent survival of probiotic lactobacilli to gastro-intestinal stresses. **Food Research**

International, v. 41, p. 539-543, 2008. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/J.FOODRES.2008.03.003>.

CHAMPAGNE, C.P.; RAYMOND, Y.; GAGNON, R. Viability of *Lactobacillus rhamnosus* R0011 in an apple-based fruit juice under simulated storage conditions at the consumer level. **Journal of Food Science**, v. 73, n. 5, p. 221-226, 2008. Disponível em: <https://doi.org/10.1111/j.1750-3841.2008.00775.x>.

CHEN, C.C.; PAULL, R. F. Sugar metabolism and pineapple flesh translucency. **Journal of American Society for Horticulture Science**, v. 125, n. 5, p. 558–562, 2000. Disponível em: <https://journals.ashs.org/downloadpdf/journals/jashs/125/5/article-p558.pdf>.

CHEN, J. *et al.* Issues deserve attention in encapsulating probiotics: Critical review of existing literature. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 57, n. 6, p. 1228–1238, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1080/10408398.2014.977991>.

COLLINS, A. R.; HARRINGTON, V. Antioxidants; not the only reason to eat fruit and vegetables. **Phytochemistry Reviews**, v. 1, n. 2, p. 167–174, 2002. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1023/A:1022514432233>.

CONCEIÇÃO, R. C. N. ***Lactobacillus paracasei* microencapsulados com alginato de cálcio revestidos com gelatina: sobrevivência in vitro e aplicação em bebidas à base de oleaginosas**. 2016. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) – Universidade Federal do Tocantins, Gurupi, 2016. Disponível em: <https://repositorio.uft.edu.br/bitstream/11612/417/1/Rosetania%20Correia%20Neves%20da%20Concei%C3%A7%C3%A3o%20-%20Vers%C3%A3o%20editada.pdf>.

CORCORAN, B. M. *et al.* Survival of probiotic lactobacilli in acidic environment is enhanced in the presence of metabolizable sugars. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 71, p. 3060-3067, 2005.

CORTÉS-GIRALDO, I. *et al.* Purification of free arginine from chickpea (*Cicer arietinum*) seeds. **Food Chemistry**, v. 192, p. 114–118, 1 fev. 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2015.07.001>.

COSTA, M. G. M. *et al.* Sonicated pineapple juice as substrate for *L. casei* cultivation for probiotic beverage development: Process optimisation and product stability. **Food Chemistry**, v. 139, n. 1–4, p. 261–266, 2013. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2013.01.059>.

DAI, Z. *et al.* Effects of α -galactooligosaccharides from chickpeas on high-fat-induced metabolic syndrome in mice. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 65, n. 15, p. 3160-3166, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.7b00489>.

DAVE, R. I.; SHAH, N. P. Viability of yoghurt and probiotic bacteria in yoghurts made from commercial starter cultures. **International Dairy Journal**, v. 7, n.1, p. 31-41, 1997. Disponível em: [https://doi.org/10.1016/s0958-6946\(96\)00046-5](https://doi.org/10.1016/s0958-6946(96)00046-5).

DE ANGELIS, M.; GOBBETTI, M. Environmental stress responses in *Lactobacillus*: A review. **Proteomics**, v. 4, n. 1, p. 106-122, 2004. Disponível em: <https://doi.org/10.1002/pmic.200300497>.

DE CAMARGO, A. C. *et al.* Is chickpea a potential substitute for soybean? Phenolic Bioactives and potential health benefits. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 20, n. 11, p. 2644, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/ijms20112644>.

DE VRESE, Michael; SCHREZENMEIR, J. Probiotics, prebiotics and synbiotics. *In*: STAHL, U.; DONALIES, U. E.; NEVOIGT, E. (org.). **Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology**. Berlin: Springer, 2008. Disponível em: https://doi.org/10.1007/10_2008_097.

DEBNATH, B.; SINGH, W. S.; MANNA, K. A phytopharmacological review on Ananas comosus. **Advances in Traditional Medicine**, n. 0123456789, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s13596-021-00563-w>.

DONKOR, O. N. *et al.* Survival and activity of selected probiotic organisms in set-type yoghurt during cold storage. **International Dairy Journal**, v. 17, n. 6, p. 657-665, 2007. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2006.08.006>.

EL-ADAWY, T. A. Nutritional composition and antinutritional factors of chickpeas (*Cicer arietinum* L.) undergoing different cooking methods and germination. **Plant Foods for Human Nutrition**, v. 57, n. 1, p. 83-97, 2002. Disponível em: <https://doi.org/10.1023/a:1013189620528>.

ESPIRITO-SANTO, A. P.; CARLIN, F.; RENARD, C. M. G. C. Apple, grape or orange juice: Which one offers the best substrate for *lactobacilli* growth? - A screening study on bacteria viability, superoxide dismutase activity, folates production and hedonic characteristics. **Food Research International**, v. 78, p. 352–360, 2015. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodres.2015.09.014>.

FARIDY, J. C. M. *et al.* Biological Activities of Chickpea in Human Health (*Cicer arietinum* L.). A Review. **Plant Foods for Human Nutrition**, v. 75, n. 2, p. 142–153, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s11130-020-00814-2>.

FIOCCO, D. *et al.* How probiotics face food stress: They get by with a little help. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 60, n. 9, p. 1552-1580, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1080/10408398.2019.1580673>.

FLEMING, H. P.; MCFEETERS, R. F.; BREIDT, F. Fermented and Acidified Vegetables. *In*: DOWNES, F. P.; ITO, K. (ed.). **Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods**. 4ª edição. Washington, DC, EUA: American Public Health Association, 2001.

FLOCH, Martin H. The Role of Prebiotics and Probiotics in Gastrointestinal Disease. *In*: UKLEJA, A. (ed.). **Gastroenterology Clinics of North America**. Nutritional Management of Gastrointestinal Disease. Elsevier Inc., 2018. Vol. 47, n. 1, p. 179-191. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.gtc.2017.09.011>.

FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS. Fruits and vegetables. Food loss prevention in perishable crops. **FAO**, 1981. Disponível em: <http://www.fao.org/docrep/s8620e/S8620E00.htm#Contents>.

FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS/WORLD HEALTH ORGANIZATION (FAO/WHO). **Guidelines for the**

Evaluation of Probiotics in Food. London, Ontario, Canada, 2002. Disponível em: https://www.who.int/foodsafety/fs_management/en/probiotic_guidelines.pdf.

FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS. FAOSTAT – Commodity Balances. **FAO**, 2018. Disponível em: <http://www.fao.org/faostat/en/#data/BC>.

FONSECA, H. C. *et al.* Sensory and flavor-aroma profiles of passion fruit juice fermented by potentially probiotic *Lactiplantibacillus plantarum* CCMA 0743 strain. **Food Research International**, v. 152, p. 110710, 2022. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2021.110710>.

GARCIA, E. F. *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, n. 13, p. 5000-5010, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1002/jsfa.9034>.

GAREAU, M. G.; SHERMAN, P. M.; WALKER, W. A. Probiotics and the gut microbiota in intestinal health and disease. **Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology**, v. 7, n. 9, p. 503–514, 2010. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/nrgastro.2010.117>.

GBASSI, G. K. *et al.* *In vitro* effects of pH, bile salts and enzymes on the release and viability of encapsulated *Lactobacillus plantarum* strains in a gastrointestinal model. **International Dairy Journal**, v. 21, n. 2, p. 97-102, 2011. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2010.09.006>.

GEORGE, F. *et al.* Occurrence and Dynamism of Lactic Acid Bacteria in Distinct Ecological Niches: A Multifaceted Functional Health Perspective. **Frontiers in Microbiology**, v. 9, n. 2899, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.02899>.

GHAFAARI, S.; ANSARI, S. Microbial viability, physico-chemical properties and sensory evaluation of pineapple juice enriched with *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus rhamnosus* and inulin during refrigerated storage. **Journal of Food Measurement and Characterization**, v. 12, n. 4, p. 2927–2935, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s11694-018-9908-z>.

GROM, L. C. *et al.* Probiotic dairy foods and postprandial glycemia: A mini-review. **Trends in Food Science & Technology**, v. 101, p. 165–171, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2020.05.012>.

HAN, S. *et al.* Probiotic Gastrointestinal Transit and Colonization After Oral Administration: A Long Journey. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, v. 10, n. 11, p. 609-722, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.3389/fcimb.2021.609722>.

HAVENAAR, R.; BRINK, B. T.; HUIS, J. H. Selection of Strains for Probiotic Use. *In: Probiotics*. Springer: Berlin, Heidelberg, Germany, 1992. p. 209-224.

HE, G. *et al.* Acid tolerance response of *Tetragenococcus halophilus*: A combined physiological and proteomic analysis. **Process Biochemistry**, v. 51, n. 2, p. 213–219, 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2015.11.035>.

HERNÁNDEZ, Y.; LOBO, M. G.; GONZÁLEZ, M. Determination of vitamin C in tropical fruits: A comparative evaluation of methods. **Food Chemistry**, v. 96, n. 4, p. 654–664, 2006. Disponível em: https://www.researchgate.net/publication/222410917_Determination_of_vitamin_C_in_tropical_fruits_A_comparative_evaluation_of_methods.

HIGUCHI, M.; YAMAMOTO, Y.; KAMIO, Y. Molecular biology of oxygen tolerance in lactic acid bacteria: Functions of NADH oxidases and Dpr in oxidative stress. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 90, p. 484-493, 2000.

HILL, C. *et al.* Expert consensus document. The International Scientific Association for Probiotics and Prebiotics consensus statement on the scope and appropriate use of the term probiotic. **Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology**, v. 11, n. 8, p. 506-514, 2014. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/nrgastro.2014.66>.

HOLZAPFEL, W. H.; WOOD, B. J. B. **Lactic Acid Bacteria: Biodiversity and Taxonomy**. 1. ed. Chichester, West Sussex, UK: John Wiley & Sons, Ltd, 2014.

HOSSAIN, M. A. *et al.* Biochemical, Microbiological and Organoleptic Properties of Probiotic Pineapple Juice Developed by Lactic Acid Bacteria. **Journal of Scientific Research**, v. 12, n. 4, p. 743-450, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.3329/jsr.v12i4.46179>.

HOUNHOUGAN, M.H. *et al.* Effect of processing on the quality of pineapple juice. **Food Reviews International**, v. 30, n. 2, p. 112–133, 2014. Disponível em: <https://doi.org/10.1080/87559129.2014.883632>.

HUANG, S. *et al.* Double use of highly concentrated sweet whey to improve the biomass production and viability of spraydried probiotic bacteria. **Journal of Functional Foods**, v. 23, p. 453–463, 2016. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2016.10.017>.

HUSSEIN, H. *et al.* Impact of chickpea as prebiotic, antioxidant and thickener agent of stirred bio-yoghurt. **Annals of Agricultural Sciences**, v. 65, n. 1, p. 49–58, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.aosas.2020.03.001>.

HUTKINS, R. W. **Microbiology and technology of fermented foods**. 2. ed. Hutkins, R. W. (2018). *Microbiology and Technology of Fermented Foods*, 2nd Edn. Hoboken, NJ: Wiley-Blackwell, 2018. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1002/9780470277515>.

INSTITUTO ADOLFO LUTZ. **Normas Analíticas do Instituto Adolfo Lutz**. v. 1: Métodos físico-químicos para análise de alimentos. 4. ed. São Paulo: Instituto Adolfo Lutz, 2008.

ISLAM, M. Z. *et al.* Development of probiotic beverage using whey and pineapple (*Ananas comosus*) juice: Sensory and physico-chemical properties and probiotic survivability during in-vitro gastrointestinal digestion. **Journal of Agriculture and Food**

Research, v. 4, n. March, p. 100-144, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.jafr.2021.100144>.

JUKANTI, A. **Polyphenol Oxidases (PPOs) in Plants**. Springer, 2017. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1007/978-981-10-5747-2>.

JUKANTI, A. K. *et al.* Nutritional quality and health benefits of chickpea (*Cicer arietinum* L.): A review. **British Journal of Nutrition**, v. 108, supl. 1, 2012. Disponível em: <https://doi.org/10.1017/S0007114512000797>.

KARIM, A. A.; NORZIAH, M. H.; SEOW, C. C. Methods for the study of starch retrogradation. **Food Chemistry**, v. 71, n. 1, p. 9–36, 2000. Disponível em: [https://doi.org/10.1016/S0308-8146\(00\)00130-8](https://doi.org/10.1016/S0308-8146(00)00130-8).

KERRY, R.G. *et al.* Benefaction of probiotics for human health: A review. **Journal of Food and Drug Analysis**, v. 26, n. 3, p. 927-939, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.jfda.2018.01.002>.

KHALID, Nauman; AHMED, Ifthikar; SULERIA, Hafiz. Pineapple Juice. *In*: SHAHIDI, F.; ALASALVAR, C. (eds). **Handbook of Functional Beverages and Human Health**. CRC Press, 2016. p. 479-486. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1201/b19490-43>.

KLEEREBEZEM, M. *et al.* Complete genome sequence of *Lactobacillus plantarum* WCFS1. **Biological Sciences**, v. 100, n. 4, p. 1990-1995, 2003. Disponível em: <https://doi.org/10.1073/pnas.0337704100>.

KOBER, M.M.; BOWE, W.P. The effect of probiotics on immune regulation, acne, and photoaging. **International Journal of Women's Dermatology**, v. 1, n. 2, p. 85-89, 2015. Disponível em: <https://doi.org/10.1016%2Fj.ijwd.2015.02.001>.

KOU, X. *et al.* Purification and identification of antioxidant peptides from chickpea (*Cicer arietinum* L.) albumin hydrolysates. **LWT - Food Science and Technology**, v. 50, n. 2, p. 591–598, 2013. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2012.08.002>.

LAORKO, A. *et al.* Effect of membrane property and operating conditions on phytochemical properties and permeate flux during clarification of pineapple juice. **Journal of Food Engineering**, v. 100, n. 3, p. 514–521, 2010. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2010.04.039>.

LEBLANC, J. G. *et al.* Bacteria as vitamin suppliers to their host: a gut microbiota perspective. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 24, n. 2, p. 160-168, 2013. Disponível: <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2012.08.005>.

LEBLANC, J. G. *et al.* B-group vitamin production by lactic acid bacteria—current knowledge and potential applications. **Journal of Applied Microbiology**, v. 111, n. 6, p. 1297–1309, 2011. Disponível em: <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2011.05157.x>.

LOPES, M. *et al.* Legume Beverages from Chickpea and Lupin, as New Milk Alternatives. **Foods**, v. 9, n. 10, p. 1458, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/foods9101458>.

LOPETUSO, L.R. *et al.* Bacteriocins and Bacteriophages: Therapeutic Weapons for Gastrointestinal Diseases?. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 20, n. 1, p. 183, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.3390%2Fijms20010183>.

SERVIÇO SOCIAL DA INDÚSTRIA (SESI-SP). Teor de nutrientes contidos em 100 gramas de material fresco. *In: Programa Alimente-se Bem: tabela de composição química das partes não convencionais dos alimentos*. 2ed. Ano 2020. p. 1-49. Disponível em: <https://alimentesebem.sesisp.org.br/arquivos/publicacao/tabela-de-composicao-das-partes-nao-convencionais-dos-alimentos>.

MAHAN, K. L.; ESCOTT-STUMP, S. *In: Krause: Alimentos, Nutrição e Dietoterapia*. 11. ed. São Paulo: Roca, 2005.

MARAGKOUidakis, P. A. *et al.* Probiotic Potential of *Lactobacillus* Strains Isolated from Dairy Products. **International Dairy Journal**, v. 16, n. 3, p. 189-199, 2006. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2005.02.009>.

MARRERO, Silvia Carballo *et al.* New Trends and Applications in Fermented Beverages. *In: GRUMEZESCU, A. M.; HOLBAN, A. M. (ed.). Fermented Beverages*. Volume 5: The Science of Beverages. Woodhead Publishing, 2019. p. 31-66. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/C2017-0-02379-0>.

MONTEIRO, S. S. *et al.* Production of Probiotic Passion Fruit (*Passiflora edulis* Sims f. *Flavicarpa* Deg.) Drink Using *Lactobacillus reuteri* and Microencapsulation via Spray Drying. **Foods**, v. 9, n. 3, 2020. Disponível em: <https://dx.doi.org/10.3390%2Ffoods9030335>.

MOKHTARI, S.; JAFARI, S. M.; KHOMEIRI, M. Survival of encapsulated probiotics in pasteurized grape juice and evaluation of their properties during storage. **Food Science and Technology International**, v. 25, n. 2, p. 120–129, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1177/1082013218801113>.

MESQUITA, M. C. *et al.* Survival of *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei* LBC 81 in fermented beverage from chickpeas and coconut in a static in vitro digestion model. **Fermentation**, v. 7, n. 3, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/fermentation7030135>.

MESQUITA, M. C. *et al.* Fermentation of chickpea (*Cicer arietinum* L.) and coconut (*Coccus nucifera* L.) beverages by *Lactobacillus paracasei* subsp *paracasei* LBC 81: The influence of sugar content on growth and stability during storage. **LWT - Food Science and Technology**, v. 132, n. 1, 2020. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.lwt.2020.109834>.

MARTÍN, M. J. *et al.* Microencapsulation of bacteria: A review of different technologies and their impact on the probiotic effects. **Innovative Food Science & Emerging Technologies**, v. 27, p. 15-25, 2015. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.ifset.2014.09.010>.

MARTÍNEZ-VILLALUENGA, C. *et al.* Effects of oligosaccharide removing procedure on the protein profiles of lupin seeds. **European Food Research and Technology**, v. 223, n. 5, p. 691–696, 2006. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1007/s00217-006-0254-8>.

MEDEIROS, J. C. *et al.* Survival of *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei* LBC 81 in cottage cheese supplemented with green banana, oat, or chickpea flours during refrigerated storage. **Journal of Food Processing and Preservation**, v. 44, n. 10, p. 1–8, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1111/jfpp.14780>.

MELCHIOR, S. *et al.* Effect of different biopolymer-based structured systems on the survival of probiotic strains during storage and *in vitro* digestion. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 100, n. 10, p. 3902-3909, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1002/jsfa.10432>.

MENEZES, A. G. T. *et al.* Combination of probiotic yeast and lactic acid bacteria as starter culture to produce maize-based beverages. **Food Research International**, v. 111, n. March, p. 187–197, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2018.04.065>.

MORTAZAVIAN, A. M. *et al.* Effect of refrigerated storage temperature on the viability of probiotic microorganisms in yoghurt. **International Journal of Dairy Technology**, v. 59, p. 123-127, 2007.

MOUSAVI, Z. *et al.* Fermentation of pomegranate juice by probiotic lactic acid bacteria. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 27, p. 123–128, 2011. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s11274-010-0436-1>.

NGUYEN, B.T. *et al.* Probiotic beverage from pineapple juice fermented with *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* strains. **Frontiers in Nutrition**, v. 6, p. 1-7, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.3389/fnut.2019.00054>.

NÚCLEO DE ESTUDOS E PESQUISAS EM ALIMENTAÇÃO (NEPA)/UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS (UNICAMP). **Tabela Brasileira de Composição de Alimentos – TACO**. 4ª edição revisada e ampliada. Campinas, São Paulo, 2011. Site: cfn.org.br. Disponível em: https://www.cfn.org.br/wp-content/uploads/2017/03/taco_4_edicao_ampliada_e_revisada.pdf.

NUALKAEKUL, S.; CHARALAMPOPOULOS, D. Survival of *Lactobacillus plantarum* in model solutions and fruit juices. **International Journal of Food Microbiology**, v. 146, n. 2, p. 111-117, 2011. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2011.01.040>.

NUALKAEKUL, S.; DEEPIKA, G.; CHARALAMPOPOULOS, D. Survival of freeze dried *Lactobacillus plantarum* in instant fruit powders and reconstituted fruit juices. **Food Research International**, v. 48, n. 2, p. 627–633, 2012. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.foodres.2012.06.003>>.

NUALKAEKUL, S.; SALMERON, I.; CHARALAMPOPOULOS, D. Investigation of the factors influencing the survival of *Bifidobacterium longum* in model acidic solutions and fruit juices. **Food Chemistry**, 129, n. 3, p. 1037-1044, 2011. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2011.05.071>.

OELSCHLAEGER, T. A. Mechanisms of probiotic actions – A review. **International Journal of Medical Microbiology**, v. 300, n. 1, p. 57–62, 2010. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.ijmm.2009.08.005>.

PALACHUM, W.; CHORIT, W.; CHISTI, Y. Nutritionally Enhanced Probioticated Whole Pineapple Juice. **Fermentation**, v. 7, n. 3, p. 178, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/fermentation7030178>.

PANDEY, K. R.; NAIK, S. R.; VAKIL, B. V. Probiotics, Prebiotics and Synbiotics - A Review. **Journal of Food Science and Technology**, v. 52, n. 12, p. 7577-7587, 2015. Disponível em: <https://doi.org/10.1007%2Fs13197-015-1921-1>.

PAPADIMITRIOU, K. *et al.* Stress physiology of lactic acid bacteria. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 458, n. 80, p. 837-890, 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.1128/mnbr.00076-15>.

PARVEZ, S. *et al.* Probiotics and their fermented food products are beneficial for health. **Journal of Applied Microbiology**, v. 100, n. 6, p. 1171-1185, 2006. Disponível em: <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2006.02963.x>.

PERERA, C.; HOOVER, R. Influence of hydroxypropylation on retrogradation properties of native, defatted and heat-moisture treated potato starches. **Food Chemistry**, v. 64, n. 3, p. 361–375, 1999. Disponível em: [https://doi.org/10.1016/S0308-8146\(98\)00130-7](https://doi.org/10.1016/S0308-8146(98)00130-7).

PEREIRA, A. L. F.; RODRIGUES, S. Turning Fruit Juice Into Probiotic Beverages. *In: Fruit Juices*. Elsevier: Amsterdam, The Netherlands, 2018. p. 279–287.

PHOEM, A. N.; CHANTHACHUM, S.; VORAVUTHIKUNCHAI, S. P. Applications of microencapsulated *Bifidobacterium longum* with *Eleutherine americana* in fresh milk tofu and pineapple juice. **Nutrients**, v. 7, n. 4, p. 2469–2484, 2015. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/nu7042469>.

PIMENTEL, T. C. *et al.* Probiotic viability, physicochemical characteristics and acceptability during refrigerated storage of clarified apple juice supplemented with *Lactobacillus paracasei* ssp. *paracasei* and oligofructose in different package type. **LWT – Food Science and Technology**, v. 63, n. 1, p. 415–422, 2015. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.lwt.2015.03.009>.

PIMENTEL, T. C. *et al.* Vegan probiotic products: A modern tendency or the newest challenge in functional foods. **Food Research International**, v. 140, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2020.110033>.

PITTAWAY, J. K. *et al.* Dietary supplementation with chickpeas for at least 5 weeks results in small but significant reductions in serum total and low-density lipoprotein cholesterol in adult women and men. **Annals of Nutrition and Metabolism**, v. 50, n. 6, p. 512–518, 2007. Disponível em: <https://doi.org/10.1159/000098143>. Acesso em: 6 de set. de 2021.

PRIDMORE, R. D. *et al.* The genome sequence of the probiotic intestinal bacterium *Lactobacillus johnsonii* NCC 533. **Proceedings of the National Academy of Sciences (Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America)**, v. 101, n. 8, p. 2512-2517, 2004. Disponível em: <https://doi.org/10.1073%2Fpnas.0307327101>.

RACHWA-ROSIK, D.; NEBESNY, E.; BUDRYN, G. Chickpeas - Composition, Nutritional Value, Health Benefits, Application to Bread and Snacks: A Review. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 55, n. 8, p. 1137–1145, 2015. Disponível em: <https://doi.org/10.1080/10408398.2012.687418>.

RANADHEERA, C. S. *et al.* Probiotics in goat milk products: Delivery Capacity and Ability to Improve Sensory Attributes. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, v. 18, n. 4, p. 867–882, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1111/1541-4337.12447>.

RATTANATHANALERK, M.; CHIEWCHAN, N.; SRICHUMPOUNG, W. Effect of thermal processing on the quality loss of pineapple juice. **Journal of Food Engineering**, v. 66, n. 2, p. 259–265, 2005. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2004.03.016>.

RAVINDRAN, S.; S., R. Probiotic oats milk drink with microencapsulated *Lactobacillus plantarum* – an alternative to dairy products. **Nutrition & Food Science**, v. 51, n. 3, p. 471-482, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1108/NFS-03-2020-0073>.

REUBEN, R. C. *et al.* Characterization and evaluation of lactic acid bacteria from indigenous raw milk for potential probiotic properties. **Journal of Dairy Science**, v. 103, n. 2, p. 1223–1237, 2020. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.3168/jds.2019-17092>.

RIBEIRO, A. P. de O. *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. **LWT Food Science and Technology**, v. 118, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2019.108756>.

RINCON, L.; BOTELHO, R. B. A.; ALENCAR, E. R. Development of novel plant-based milk based on chickpea and coconut. **LWT - Food Science and Technology**, v. 128, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2020.109479>.

RODRIGUES, F. J. *et al.* Encapsulated probiotic cells: Relevant techniques, natural sources as encapsulating materials and food applications – A narrative review. **Food Research International**, v. 137, p. 109-682, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2020.109682>.

ROWLAND, I. *et al.* Gut microbiota functions: metabolism of nutrients and other food components. **European Journal of Nutrition**, v. 57, n. 1, p. 1-24, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s00394-017-1445-8>.

SAARELA, M. *et al.* Fibres as carriers for *Lactobacillus rhamnosus* during freeze-drying and storage in apple juice and chocolate-coated breakfast cereals. **International Journal of Food Microbiology**, v. 112, n. 2, p. 171–178, 2006. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2006.05.019>.

SAARELA, M. *et al.* Improving the storage stability of *Bifidobacterium breve* in low pH fruit juice. **International Journal of Food Microbiology**, v. 149, p. 106-110, 2011. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2010.12.002>.

SANCHEZ, B. *et al.* Proteomics of stress response in *Bifidobacterium*. **Frontiers in Bioscience**, v. 13, n. 18, p. 6905-6919, 2008. Disponível em: <https://fbscience.com/Landmark/articles/10.2741/3198>.

SANTANA, F.F.; MEDINA, V.M. Alterações bioquímicas durante o desenvolvimento do fruto do abacaxizeiro 'Pérola'. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v. 22, n. Especial, p. 53-56, 2000.

SARMENTO, A. *et al.* Valorization of traditional foods: Nutritional and bioactive properties of *Cicer arietinum* L. and *Lathyrus sativus* L. pulses. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 95, n. 1, p. 179–185, 2015. Disponível em: <https://doi.org/10.1002/jsfa.6702>.

SCHEPPER, J. D. *et al.* Probiotics in gut-bone signaling Axis. **Advances in Experimental Medicine and Biology**, v. 1033, p. 225–247, 2017. Disponível em: https://doi.org/10.1007%2F978-3-319-66653-2_11.

SETHI, S. *et al.* Plant-based milk alternatives an emerging segment of functional beverages: a review. **Journal of Food Science and Technology**, v. 53, n. 9, p. 3408–3423, 2016. Disponível em: <https://dx.doi.org/10.1007%2Fs13197-016-2328-3>.

SHAH, N. P. Functional foods from probiotics and prebiotics. **Food Technology Magazine**, v. 55, n. 11, p. 46-53, 2001. Disponível em: <https://www.ift.org/news-and-publications/food-technology-magazine/issues/2001/november/features/functional-foods-from-probiotics-and-prebiotics>.

SIDHU, M. K. *et al.* Probiotic yogurt fortified with chickpea flour: Physico-chemical properties and probiotic survival during storage and simulated gastrointestinal transit. **Foods**, v. 9, n. 9, 2020. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.3390/foods9091144>.

SIEBERT, K. J. Effects of protein-polyphenol interactions on beverage haze, stabilization, and analysis. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 47, n. 2, p. 353–362, 1999.

SINGH, B. *et al.* Phenolic composition and antioxidant potential of grain legume seeds: A review. **Food Research International**, v. 101, p. 1–16, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2017.09.026>.

SKRZYPCZAK, K. *et al.* Reinforcement of the Antioxidative Properties of Chickpea Beverages Through Fermentation Carried Out by Probiotic Strain *Lactobacillus plantarum* 299v, **Journal of Pure and Applied Microbiology**, v. 13, n. 1, p. 1-12, 2019. Disponível em: <https://dx.doi.org/10.22207/JPAM.13.1.01>.

SOARES, B. L. de M. **Desenvolvimento de uma bebida funcional à base de caju (*Anacardium occidentale* L.) com *Lactobacillus casei* DN 114-001 livre e microencapsulado**. 2016. Dissertação (Mestrado em Nutrição) – Faculdade de Ciências da Saúde, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2016. Disponível em: https://repositorio.ufpe.br/bitstream/123456789/17621/1/DISSERTA%C3%87%C3%83O%20DE%20MESTRADO_BRUNA%20MENDON%C3%87A_CD.pdf.

SOETAN, KO; OYEWOLE, O. E. The need for adequate processing to reduce the anti-nutritional factors in plants used as human foods and animal feeds: a review. **African Journal of Food Science**, v. 3, n. 9, p. 223–232, 2009.

SONG, Y. S. *et al.* Immunoreactivity reduction of soybean meal by fermentation, effect on amino acid composition and antigenicity of commercial soy products. **Food**

Chemistry, v. 108, n. 2, p. 571-581, 2008. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2007.11.013>.

TALWALKAR, A.; KAILASAPATHY, K. The role of oxygen in the viability of probiotic bacteria with reference to *L. acidophilus* and *Bifidobacterium* spp. **Current Issues in Intestinal Microbiology**, v. 5, n. 1, p. 1-8, 2004.

TAMANG, J. P.; WATANABE, K.; HOLZAPFEL, W. H. Review: Diversity of microorganisms in global fermented foods and beverages. **Frontiers in Microbiology**, v. 7, n. 377, 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.3389%2Ffmicb.2016.00377>.

TANGYU, M. *et al.* Fermentation of plant-based milk alternatives for improved flavour and nutritional value. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 103, n. 18, p. 1-13, 2019. Disponível em: <https://link.springer.com/article/10.1007%2Fs00253-019-10175-9>.

TERPOU, A. *et al.* Probiotics in Food Systems: Significance and Emerging Strategies Towards Improved Viability and Delivery of Enhanced Beneficial Value. **Nutrients**, v. 11, n. 7, p. 1591, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/nu11071591>.

THANASSI, D. G.; CHENG, L. W.; NIKAIDO, H. Active efflux of bile salts by *Escherichia coli*. **Journal Bacteriology**, v. 179, n. 8, p. 2512-2518, 1997. Disponível em: <https://doi.org/10.1128/jb.179.8.2512-2518.1997>.

THAVARAJAH, D.; THAVARAJAH, P. Evaluation of chickpea (*Cicer arietinum* L.) micronutrient composition: Biofortification opportunities to combat global micronutrient malnutrition. **Food Research International**, v. 49, n. 1, p. 99–104, 1 nov. 2012. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2012.08.007>.

TRIPATHI, M. K.; GIRI, S. K. Probiotic functional foods: Survival of probiotics during processing and storage. **Journal of functional foods**, v. 9, p. 225-241, 2014.

U. S. FOOD & DRUG ADMINISTRATION (FDA). **Microorganisms & Microbial-Derived Ingredients Used in Food (Partial List)**, 2018. Disponível em: <https://www.fda.gov/food/generally-recognized-safe-gras/microorganisms-microbial-derived-ingredients-used-food-partial-list>.

URIOT, O. *et al.* *Streptococcus thermophilus*: From yogurt starter to a new promising probiotic candidate?. **Journal of Functional Foods**, v. 37, p. 74-89, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.jff.2017.07.038>.

VAN DE GUCHTE, M. *et al.* Stress responses in lactic acid bacteria. **Antonie Van Leeuwenhoek**, v. 82, 1-4, p. 187-216, 2002. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1023/A:1020631532202>.

VOGADO, C de. O. *et al.* Survival of *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei* LBC 81 in Fermented Milk Enriched with Green Banana Pulp Under Acid Stress and in the Presence of Bile Salts. **Probiotics and Antimicrobial Proteins**, v. 12, n. 1, p. 320–324, 2019. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1007/s12602-019-09534-9>.

- VOGADO, C. O. et al. Enrichment of Probiotic Fermented Milk with Green Banana Pulp: Characterization Microbiological, Physicochemical and Sensory. **Nutrients**, v. 10, n. 4, p. 427, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/nu10040427>.
- XU, X. et al. Chemical analysis and flavor properties of blended orange, carrot, apple and Chinese jujube juice fermented by selenium-enriched probiotics. **Food Chemistry**, v. 289, 250–258, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2019.03.068>.
- ZAABOUL, F. et al. The impact of roasting, high pressure homogenization and sterilization on peanut milk and its oil bodies. **Food Chemistry**, v. 280, p. 270–277, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2018.12.047>.
- ZANJANI, M. A. K. et al. Promoting probiotics survival by microencapsulation with Hylon starch and genipin cross-linked coatings in simulated gastro-intestinal condition and heat treatment. **Iranian Journal of Pharmaceutical Research**, v. 17, n. 2, p. 753–766, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.22037/IJPR.2018.2199>.
- ZHANG, X.-M. et al. Changes in organic acid concentrations and the relative enzyme activities during the development of Cayenne pineapple fruit. **Journal of Fruit Science**, v. 24, n. 3, p. 381–384, 2007.
- ZHANG, X.-M., et al. Roles of sucrose-metabolizing enzymes in accumulation of sugars in Cayenne pineapple fruit. **Journal of Fruit Science**, v. 23, n. 5, p. 707–710, 2006.
- ZHENG, J. et al. A taxonomic note on the genus *Lactobacillus*: Description of 23 novel genera, emended description of the genus *Lactobacillus* Beijerinck 1901, and union of *Lactobacillaceae* and *Leuconostocaceae*. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 70, n. 4, p. 2782–2858, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1099/ijsem.0.004107>.
- ZHU, W. et al. Functional efficacy of probiotic *Lactobacillus sanfranciscensis* in apple, orange and tomato juices with special reference to storage stability and in vitro gastrointestinal survival. **Beverages**, v. 6, n. 1, p. 1–9, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/beverages6010013>.
- ZIA-UL-HAQ, M. et al. Nutritional and compositional study of Desi chickpea (*Cicer arietinum* L.) cultivars grown in Punjab, Pakistan. **Food Chemistry**, v. 105, n. 4, p. 1357–1363, 2007. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2007.05.004>.
- ZUIDAM, N. J.; NEDOVIC, V. **Encapsulation technologies for active food ingredients and food processing**. New York: Springer-Verlag, 2010. 554 p.
- WANG, C.; CUI, Y.; QU, X. Mechanisms and improvement of acid resistance in lactic acid bacteria. **Archives of Microbiology**, v. 200, n. 2, p. 195–201, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s00203-017-1446-2>.
- WANG, N. et al. Effect of cooking on the composition of beans (*Phaseolus vulgaris* L.) and chickpeas (*Cicer arietinum* L.). **Food Research International**, v. 43, n. 2, p. 589–594, 2010. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodres.2009.07.012>. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2009.07.012>.
- WANG, S.; CHELIKANI, V.; SERVENTI, L. Evaluation of chickpea as alternative to soy in plant-based beverages, fresh and fermented. **LWT - Food Science and**

Technology, v. 97, p. 570–572, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2018.07.067>.

WORLD GASTROENTEROLOGY ORGANISATION (WGO). **Diretrizes Mundiais da Organização Mundial de Gastroenterologia: Probióticos e prebióticos**. 2017. Disponível em: <https://www.worldgastroenterology.org/guidelines/probiotics-and-prebiotics>.

WU, C. *et al.* A combined physiological and proteomic approach to reveal lactic-acid-induced alterations in *Lactobacillus casei* Zhang and its mutant with enhanced lactic acid tolerance. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 93, n. 2, p. 707–722, 2012. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s00253-011-3757-6>.

WU, Y. *et al.* Fermentation of blueberry and blackberry juices using *Lactobacillus plantarum*, *Streptococcus thermophilus* and *Bifidobacterium bifidum*: Growth of probiotics, metabolism of phenolics, antioxidant capacity *in vitro* and sensory evaluation. **Food Chemistry**, v. 348, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2021.129083>.

YAO, M. F. *et al.* Enhanced viability of probiotics (*Pediococcus pentosaceus* Li05) by encapsulation in microgels doped with inorganic nanoparticles. **Food Hydrocolloids**, v. 83, p. 246–252, 2018. Disponível em: 10.1016/j.foodhyd.2018.05.024.

YAO, M. F. *et al.* Progress in microencapsulation of probiotics: A review. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, v. 19, n. 2, p. 857-874, 2020. Disponível em: 10.1111/1541-4337.12532.

YING, D. Y. *et al.* Effect of encapsulant matrix on stability of microencapsulated probiotics. **Journal of Functional Foods**, v. 25, p. 447–458, 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.jff.2016.06.020>.

