

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA  
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS  
DEPARTAMENTO DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE ALIMENTOS  
CURSO DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE ALIMENTOS

Roblessa Sant'Anna de Abreu

**Potencial prebiótico de polpa de uvaia (*Eugenia pyriformis*) adicionada em bebida  
fermentada vegetal**

Florianópolis

2022

Roblessa Sant'Anna de Abreu

**Potencial prebiótico de polpa de uvaia (*Eugenia pyriformis*) adicionada em bebida fermentada vegetal**

Trabalho Conclusão do Curso de Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos do Centro de Ciências Agrárias da Universidade Federal de Santa Catarina como requisito para a obtenção do título de Bacharel em Ciência e Tecnologia de Alimentos.  
Orientador: Prof. Dra<sup>a</sup> Silvani Verruck

Florianópolis

2022

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor,  
através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Universitária da UFSC.

Abreu, Roblessa Sant'Anna de  
Potencial prebiótico de polpa de uvaia (*Eugenia  
pyriformis*) adicionada em bebida?? fermentada vegetal? /  
Roblessa Sant'Anna de Abreu ; orientadora, Silvani  
Verruck, 2022.  
48 p.

Trabalho de Conclusão de Curso (graduação) -  
Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências  
Agrárias, Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos,  
Florianópolis, 2022.

Inclui referências.

1. Ciência e Tecnologia de Alimentos. 2.  
Lacticaseibacillus rhamnosus GG. 3. Probiótico. 4. Ervilha.  
5. Arroz. I. Verruck, Silvani. II. Universidade Federal de  
Santa Catarina. Graduação em Ciência e Tecnologia de  
Alimentos. III. Título.

Roblessa Sant'Anna de Abreu

**Potencial prebiótico de polpa de uvaia (*Eugenia pyriformis*) adicionada em bebida fermentada vegetal**

Este Trabalho Conclusão de Curso foi julgado adequado para obtenção do Título de Bacharel e aprovado em sua forma final pelo Curso de Ciência e Tecnologia de Alimentos

Local, 14 de julho de 2022.

---

Prof., Dr<sup>a</sup>. Ana Carolina de Oliveira Costa  
Coordenadora do Curso

**Banca Examinadora:**

---

Prof.(a) Silvani Verruck, Dr.(a)  
Orientadora  
Universidade Federal de Santa Catarina

---

Prof.(a) Carmen Maria Olivera Müller, Dr.(a)  
Avaliadora  
Universidade Federal de Santa Catarina

---

Prof.(a) Marilia Miotto, Dr.(a)  
Avaliadora  
Universidade Federal de Santa Catarina

## AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, Daltro e Ângela por tudo que fizeram e fazem por mim, pelo apoio e força em todos os momentos, por não me deixar desacreditar diante das dificuldades e todos os gestos de amor que vocês me transmitem, obrigada por tudo.

Aos meus tios Márcio e Marcelo, obrigada por todo apoio e carinho, por sempre me incentivarem e acreditarem em mim, muito obrigada.

A minha tia Nair, que me acolheu em sua casa para que eu pudesse me preparar para prestar o vestibular, que cuidou de mim como se fosse uma filha, obrigada por tudo.

As minhas amigas Ana Patrícia e Lurian, que estão comigo desde o início da graduação, que acompanharam em tempo real todas as alegrias e dificuldades. Eu não teria conseguido sem o apoio de você, muito obrigada por tudo.

A professora Silvani, que acreditou em mim e que me abriu as portas de seu laboratório, pela paciência, atenção, auxílio e disponibilidade, por sempre compartilhar o seu melhor. Muito obrigada por todos os ensinamentos.

Agradeço ao professor Juliano, que graças às suas aulas maravilhosas de Microbiologia de Alimentos, não me fez desistir do curso.

Ao Callebe e a Thaísa, que me ajudaram em algumas etapas da parte experimental deste trabalho. Obrigada pela disponibilidade e paciência de vocês.

Agradeço às minhas amigas da faculdade Alice, Ana, Brenda e Laiz, por terem tornado essa experiência mais leve e divertida.

Agradeço a Gabrielly, que realizou as análises físico-químicas da polpa de uvaia. Gratidão.

Aos remanescentes do R4 que estão comigo há 8 anos, obrigada por todo o apoio, conselhos, risadas e surtos ao longo desse tempo, amo vocês.

Agradeço também a todas as pessoas que de certa forma foram importantes para que eu pudesse chegar até aqui, mas que (in) felizmente já não fazem mais parte da minha vida, valeu.

Agradeço a Universidade Federal de Santa Catarina e ao Curso de Ciência e Tecnologia de Alimentos.

## RESUMO

Ao longo dos anos é notável a crescente busca por alimentos de origem vegetal como alternativas preferenciais às proteínas animais. Aliado a este interesse, os alimentos funcionais probióticos e prebióticos também apresentam amplo interesse dos consumidores. Estudos recentes indicam que compostos fenólicos podem atuar como compostos prebióticos, modulando a microbiota intestinal. Neste sentido, o objetivo deste trabalho foi analisar o potencial prebiótico da polpa de uvaia adicionada a uma bebida fermentada vegetal a base de proteína de ervilha e de arroz. Primeiramente foi realizada a contagem inicial de células viáveis da bactéria probiótica *Lacticaseibacillus rhamnosus* GG na bebida vegetal controle (sem adição de polpa), amostra com 5% de polpa de uvaia e amostra com 10% de polpa de uvaia. Depois, foi verificada a taxa de recuperação de *L. rhamnosus* GG através da contagem de células viáveis após as 48h das etapas das condições gastrointestinais simuladas *in vitro* as quais as três amostras de bebidas foram submetidas, sequencialmente através das etapas da boca, estômago, íleo e cólon. Inicialmente, todas as amostras apresentaram altas concentrações de células viáveis e foram possíveis de serem consideradas probióticas ( $> 9 \log \text{ UFC g}^{-1}$ ). As altas contagens de células viáveis permaneceram durante toda a passagem pelo sistema gastrointestinal, inclusive na etapa do íleo, onde efetivamente tem maior potencial de ação probiótica. Ao final da fase intestinal, as amostras controle (106,89%) e com 5% de polpa de uvaia (109,38%) apresentaram maiores taxas ( $p < 0,05$ ) de recuperação em comparação à amostra adicionada de 10% de polpa de uvaia (102,20%). Sendo assim, a adição de 10% de polpa de uvaia em bebida vegetal não é recomendada devido a atividade inibitória apresentada frente ao *L. rhamnosus* GG. No entanto, todas as contagens apresentavam-se elevadas ( $> 9 \log \text{ UFC g}^{-1}$ ), indicando que independente da adição de 5% polpa de uvaia ou não, a bebida vegetal a base de proteína de ervilha e arroz apresenta-se como uma alternativa promissora para o carreamento de *L. rhamnosus* GG.

**Palavras-chave:** *Lacticaseibacillus rhamnosus* GG; Probiótico; Ervilha; Arroz;

## ABSTRACT

Over the years, the increase in the search for plant-based foods as preferred alternatives to animal proteins stands out. Allied to this interest, probiotic and prebiotic functional foods are also of great interest to consumers. Recent studies indicate that phenolic compounds can act as prebiotic compounds, modulating the intestinal microbiota. In this sense, the objective of this work was to analyze the prebiotic potential of uvaia pulp added to a fermented vegetable beverage manufactured with pea and rice proteins. First, the initial viable cells count of the probiotic bacteria *Lacticaseibacillus rhamnosus* GG was performed in the control vegetable drink (without addition of pulp), sample with 5% of uvaia pulp and sample with 10% of uvaia pulp. Then, the survival rate of *L. rhamnosus* GG was verified after 48h during the steps of the simulated *in vitro* gastrointestinal condition. The three samples were submitted sequentially through the steps of the mouth, stomach, ileum, and colon. Initially, all samples showed high concentrations of viable cells count and can be considered probiotic ( $> 9 \log \text{CFU g}^{-1}$ ). The addition of uvaia pulp showed greater protection to the probiotic in the gastric stage, probably due to the presence of gallic acid in these samples, which acted as a protector under these conditions. The high counts of viable cells remained throughout the passage through the gastrointestinal system, including the ileum stage, where it effectively has the greatest potential for probiotic action. At the end of the intestinal phase, the control samples (106.89%) and samples with 5% of uvaia pulp (109.38%) had higher survival rates compared to the sample added with 10% of uvaia pulp (102.20 %). Therefore, the addition of 10% of uvaia pulp in a vegetable drink is not recommended due to the inhibitory activity presented against *L. rhamnosus* GG. However, all counts were high ( $> 9 \log \text{CFU g}^{-1}$ ), indicating that regardless of the addition of 5% uvaia pulp or not, the vegetable beverage based on pea and rice protein represents a promising alternative for carrying *L. rhamnosus* GG.

**Keywords:** *Lacticaseibacillus rhamnosus* GG; Probiotic; Pea; Rice;

## LISTA DE FIGURAS

**Figura 1.** Imagem dos frutos de uvaia (*Eugenia pyriformis*).

**Figura 2.** Taxa de recuperação (%) de *L. rhamnosus* GG durante a simulação das condições gastrointestinais *in vitro*. Fase oral (2min), Fase gástrica (2h), Fase ileal (4h), Fase intestinal (6h – 48h). Amostra controle (■); Amostra com 5% de polpa de uvaia (●); e amostra com 10% de polpa de uvaia (▲).



## LISTA DE TABELAS

**Tabela 1.** Concentrações dos fluídos utilizados nas etapas de simulação gastrointestinal.

**Tabela 2.** Contagens de células viáveis (log UFC g<sup>-1</sup>) de *L. rhamnosus* durante a simulação das condições gastrointestinais *in vitro*.

**LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS**

CAGR	Taxa de Crescimento Anual Composta
FAO	Food and Agriculture Organization of the United Nations.
FIESP	Federação das Indústrias do Estado de São Paulo
GVR	Grand View Research
ITAL	Instituto de Tecnologia de Alimentos
LGG	<i>Lacticaseibacillus rhamnosus</i> Gorbach e Goldwin
MRS	Ágar De Man, Rogosa e Sharpe
OMS	Organização Mundial da Saúde
pH	Ponto Hidrogeniônico
SIF	Fluido Intestinal Simulado
SGS	Fluido Gástrico Simulado
SSF	Fluido Salivar Simulado
SLF	Fluído do Intestino Grosso Simulado
UFC	Unidades Formadoras de Colônias

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	13
<b>2 OBJETIVOS</b> .....	14
<b>2.1 OBJETIVO GERAL</b> .....	14
<b>2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS</b> .....	14
<b>3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</b> .....	16
<b>3.1 Uvaia</b> .....	16
3.1.1 Compostos bioativos como potenciais prebióticos .....	17
<b>3.2 Probióticos</b> .....	19
3.2.1 <i>L. rhamnosus</i> GG.....	20
<b>3.3 Bebidas vegetais</b> .....	21
3.3.1 Proteínas de ervilha .....	24
3.3.2 Proteínas de Arroz .....	25
<b>4 MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	26
<b>5 RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	31
<b>6 CONCLUSÃO</b> .....	37
<b>REFERÊNCIAS</b> .....	38

## 1. INTRODUÇÃO

Recentemente, observa-se um aumento na pesquisa de novos componentes naturais e no desenvolvimento de novos produtos, possibilitando a inovação na área de alimentos e a criação de novos nichos de mercado, principalmente relacionados a produtos funcionais (PIMENTEL *et al.*, 2021). Nesse sentido, houve um aumento de adeptos à dieta vegetariana e vegana e da busca de consumidores por produtos com alto valor nutricional e funcional. Além disso, muitos consumidores procuram por alternativas de extratos à base de plantas por motivos de sustentabilidade, saúde, estilo de vida e dieta, ou por preocupações sociais ou políticas, resultando em uma crescente demanda por estes produtos no mercado (TANGYU *et al.*, 2019; PLOLL *et al.*, 2020).

De acordo com a Vegan Society (2020), a demanda por alimentos sem carne cresceu 987% em 2017 no Reino Unido (UK). No Brasil, 30 milhões de pessoas não comem carne, o que representa 14% de todos os habitantes do país. Ainda assim, 55% da população brasileira gostaria de consumir mais produtos veganos, 49% acreditam que esses produtos têm a mesma qualidade dos produtos de origem animal e 60% não consomem mais produtos veganos porque seus preços são considerados mais elevados do que os de origem animal (IBOPE, 2018). Além disso, ao longo dos anos, o mercado global de alternativas ao leite tornou-se um negócio multibilionário e corresponderá a aproximadamente 26 bilhões de dólares até 2023 (TANGYU *et al.*, 2019). Atualmente, as principais proteínas vegetais utilizadas pela indústria de alimentos são derivadas de soja e trigo. Porém, devido ao seu potencial alergênico, têm-se buscado fontes alternativas de proteínas (SHEVKANI *et al.*, 2015). A ervilha e o arroz são duas opções promissoras pois não apresentam características alergênicas e seus perfis de aminoácidos se complementam, além de possuírem alta digestibilidade e valor biológico comparados à proteína de soja (ZHAO *et al.*, 2020). Do ponto de vista nutricional, as ervilhas contêm cerca de 20% a mais de proteínas e maiores teores de lisina e triptofano que os grãos de cereais, porém por ser uma leguminosa, é deficiente em metionina. Também apresentam entre 5% e 20% a menos de inibidores de tripsina do que a soja (SHEVKANI *et al.*, 2015).

Nesse cenário, o desenvolvimento de produtos nutricionalmente balanceados e/ou que tenham valor agregado se destacam. Os produtos probióticos se destacam por sua eficácia e segurança comprovada, e pela adaptabilidade das culturas probióticas a diferentes matrizes alimentares (PIMENTEL *et al.*, 2021). A eficácia dos probióticos está associada à sua viabilidade nos produtos alimentícios o que constituiu um desafio em virtude de vários fatores serem responsáveis por reduzi-la. Portanto, várias abordagens são realizadas para melhorar e

sustentar a viabilidade celular microbiana, como a seleção adequada de probióticos e a utilização de matrizes alimentares adequadas. O desenvolvimento de combinações simbióticas entre culturas e matrizes é outra abordagem para estimular o crescimento de probióticos (SENGUPTA *et al.*, 2019). Neste sentido, o uso de substâncias consideradas prebióticas em produtos vegetais poderiam melhorar a taxa de recuperação dos probióticos durante o armazenamento do produto, bem como sua viabilidade durante a passagem através do sistema gastrointestinal (GIBSON *et al.*, 2017).

Os prebióticos têm efeitos indiretos na saúde, uma vez que a sua função é nutrir seletivamente os microrganismos probióticos, causando assim a modificação na microbiota do hospedeiro (GIBSON *et al.*, 2017). Tradicionalmente os prebióticos clássicos são fibras, no entanto, outros compostos como ácidos graxos poli-insaturados ou compostos fenólicos também podem se enquadrar nesta classificação (ALVES-SANTOS *et al.*, 2020). Os compostos fenólicos têm a capacidade de modular a microbiota intestinal, assim, essa interação pode regular o metabolismo e a biodisponibilidade dos compostos fenólicos transformando-os em metabólitos com efeitos benéficos em distúrbios cardiometabólicos, neurodegenerativos e oncológicos (GIBSON *et al.*, 2017). Apesar disso, ainda não há evidências conclusivas do efeito prebiótico dos compostos fenólicos, sendo este um campo de atuação emergente entre especialistas da área (ALVES-SANTOS *et al.*, 2020). Neste sentido, o estudo de frutas nativas com potencial prebiótico tem sido reportado (LACERDA *et al.*, 2020).

As frutas nativas brasileiras, como a uvaia, são fontes importantes de compostos bioativos, os quais têm grande relevância para promover a saúde do ser humano (SGANZERLA *et al.*, 2021). A uvaia possui altas concentrações de compostos fenólicos, inclusive valores superiores a outras frutas popularmente mais consumidas, como manga, melão e abacaxi (STAFUSSA *et al.*, 2018). Altos teores de ácidos fenólicos, flavonoides, flavan-3-óis e flavonas têm sido reportados em polpa de uvaia (FARIAS *et al.*, 2020). Isso elucida o potencial da uvaia adicionada em alimentos e bebidas com o objetivo de enriquecimento destes com compostos fenólicos e seu potencial de atuação como prebiótico.

## 2. OBJETIVOS

### 2.1 Objetivo Geral

Avaliar o potencial prebiótico da polpa de uvaia adicionada em uma bebida vegetal fermentada com *Lactocaseibacillus rhamnosus* GG (LGG) durante a passagem através do sistema gastrointestinal *in vitro*.

### 2.2 Objetivos Específicos

- Desenvolver bebidas fermentadas a base de proteína de ervilha e proteína de arroz sem adição de polpa de uvaia (controle) e com adição de 5% e 10% de polpa de uvaia;
- Avaliar a contagem de *Lactocaseibacillus rhamnosus* GG após a fermentação de bebidas a base de proteína de ervilha e proteína de arroz;
- Analisar a recuperação de *Lactocaseibacillus rhamnosus* GG em bebidas fermentadas a base de proteína de ervilha e proteína de arroz sem adição de polpa de uvaia (controle), com 5% e 10% de polpa de uvaia após a passagem pelas condições orais, gástricas e do intestino delgado simuladas.

### 3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

#### 3.1 Uvaia (*Eugenia pyriformis* Cambess)

Devido às suas condições geográficas e climáticas, o Brasil encontra-se em 3º lugar no ranking mundial como maiores produtores de frutas comuns, como laranja, banana e uva. O território brasileiro apresenta diversos biomas, incluindo a Mata Atlântica, que, infelizmente, também é um dos mais devastados pela ação humana, apresentando atualmente apenas 12,4% de sua área original (Sos Mata Atlântica, 2021). Apesar do desmatamento, a Mata Atlântica ainda apresenta uma grande biodiversidade, dando destaque a abundância de frutas nativas com potencial global para consumo e industrialização. Graças aos recursos ecológicos, essa região possui um importante fator para o desenvolvimento sustentável da Mata Atlântica brasileira (SGANZERLA *et al.*, 2021; LOPES *et al.*, 2018).

Dentre as frutas nativas oriundas da Mata Atlântica brasileira, tem-se a Uvaia (*Eugenia pyriformis* Cambess) que pertence à família Myrtaceae. Esta é uma das espécies mais importantes da flora brasileira, com grande potencial econômico e nutricional (RODRIGUES *et al.*, 2021). Popularmente é conhecida como uvaia”, “uvalha”, “uvaia do mato”, “uvaieira”, “uvalheira”, “pometo-azedo” e “azedinha” nas diferentes regiões onde são encontradas (Figura 1). Esta espécie é predominantemente encontrada no litoral brasileiro, das regiões Nordeste a Sul. Em alguns países da América do Sul, como Paraguai e Argentina, também é possível encontrar essa fruta, porém, sua ocorrência não é tão expressiva quando comparada ao Brasil (RODRIGUES *et al.*, 2021).

**Figura 1.** Frutos de uvaia (*Eugenia pyriformis*).



Fonte: Viveiro Ciprest (2018)

Os frutos de uvaia possuem forma esférica, achatada e piriforme, apresentando uma textura macia e sua coloração variando entre amarelo e alaranjado. Possuem aroma agradável e característico, sendo descrito como marcante, com notas doces e ácidas (DA SILVA *et al.*, 2019). Apresenta uma grande importância econômica para os produtores locais. Os frutos de uvaia possuem coloração e aromas atrativos aos consumidores, juntamente de sua composição química rica em compostos fenólicos. Tais fatores são responsáveis pelo potencial econômico desta fruta, que pode ser consumida *in natura*, processada, como sucos, geleias, licores, sorvetes, e até mesmo como matéria-prima para cosméticos (NATURALIS; BRANCO. 2021). Além de ser uma fruta reconhecida por seu alto valor nutricional e como fonte de compostos bioativos, são ricos em fibras, minerais, açúcares solúveis e proteínas (DA SILVA *et al.*, 2019; SGANZERLA *et al.*, 2019; SILVA *et al.*, 2018).

As frutas nativas brasileiras são fontes importantes de compostos bioativos, os quais têm grande relevância para promover a saúde do ser humano (SGANZERLA *et al.*, 2021). A Mata Atlântica brasileira apresenta uma grande variedade de frutas como fontes naturais de compostos antioxidantes, com alto potencial de utilização na indústria, além de apresentarem diversos efeitos benéficos para a saúde humana (HAMINIUK *et al.*, 2014). Levando em consideração esses potenciais, é de suma importância que seja influenciada a exploração e comercialização em maior escala, bem como o desenvolvimento de tecnologias e processos para o aproveitamento dos frutos, além da caracterização e informações científicas sobre essa espécie (ROCHA *et al.*, 2022).

Os compostos fenólicos são antioxidantes naturais pertencentes a uma complexa classe com mais de 8.000 compostos. Foi comprovado que a uvaia possui altas concentrações desses compostos, inclusive valores superiores a outras frutas popularmente mais consumidas, como manga, melão e abacaxi (STAFUSSA *et al.*, 2018). Isso elucida o potencial da uvaia adicionada em produtos com o objetivo de enriquecimento destes com compostos bioativos.

Foram identificados compostos fenólicos na polpa e semente de uvaia, como ácidos fenólicos, flavonoides, flavan-3-óis e flavonas (FARIAS *et al.*, 2020). Em outro estudo, foram identificados e quantificados 12 compostos fenólicos na polpa de uvaia, tendo como destaque o ácido gálico, que apresenta grande capacidade antioxidante como bloqueador de radicais livres (SILVA *et al.*, 2014). Tal capacidade tem sido associada a outros efeitos biológicos além da atividade antioxidante, como por exemplo atividade anticarcinogênica e anti-inflamatória. Isso tudo se deve provavelmente à estrutura química do ácido gálico e a conformação de seu radical, assim como os grupamentos hidroxila, as substituições de anéis fenólicos e a esterificação do grupo carboxila (KAHKESHANI *et al.*, 2019).



Os carotenoides são pigmentos naturais com características bioativas, tendo como principal função um potencial antioxidante capaz de eliminar espécies reativas de oxigênio. Além disso, alguns carotenoides também apresentam função pró vitamina A, atuando na saúde de vários órgãos. Os principais carotenoides encontrados na uvaia são criptoxantina,  $\beta$ -caroteno,  $\alpha$ -caroteno, luteína e zeaxantina. Sendo o  $\beta$ -caroteno com alto potencial para ser clivado em vitamina A, enquanto a luteína e a zeaxantina são pigmentos responsáveis pela proteção dos olhos (EGGERSDORFER *et al.*, 2018).

### **3.1.1 Compostos bioativos como potenciais prebióticos**

Os prebióticos têm efeitos indiretos na saúde, uma vez que a sua função é alimentar seletivamente os microrganismos, causando assim a modificação na microbiota do hospedeiro, conferindo benefícios à saúde (GIBSON *et al.*, 2017). Em 2017, a International Scientific Association for Probiotics and Prebiotics (ISAPP) juntamente com Gibson, um dos autores responsáveis pela definição inicial de prebióticos, publicou uma “Declaração de consenso” recomendando uma nova definição de prebióticos: “um substrato que é seletivamente utilizado por microrganismos hospedeiros que conferem um benefício à saúde” (GIBSON *et al.*, 2017). Tradicionalmente os prebióticos clássicos são fibras, no entanto, a partir desta nova definição, outros compostos como ácidos graxos poli-insaturados ou compostos fenólicos também podem se enquadrar na nova definição (ALVES-SANTOS *et al.*, 2020).

Os compostos fenólicos são metabólitos secundários de plantas que apresentam baixa disponibilidade e são metabolizados no intestino grosso, favorecendo interações intestinais com microrganismos. Segundo Noad *et al.* (2016) o consumo regular de compostos fenólicos dietéticos reduz riscos de doenças cardiometabólicas, pois os compostos fenólicos possuem ação antilipêmica, antidiabética, anti-oxidante e anti-inflamatória. Porém, tais benefícios dependem de alguns fatores como absorção e biodisponibilidade, que estão relacionados com os aspectos de composição e funcionalidade da modulação da microbiota intestinal. Os compostos fenólicos modulam a microbiota intestinal, e os microrganismos modulam as atividades desses compostos fenólicos, assim, essa interação pode regular o metabolismo e a biodisponibilidade dos compostos fenólicos transformando-os em metabólitos. Estes metabólitos podem gerar diversos efeitos na saúde do organismo hospedeiro, como efeitos benéficos em distúrbios cardiometabólicos, neurodegenerativos e oncológicos, o que pode ser devido às suas propriedades antioxidantes e anti-inflamatórias (GIBSON *et al.*, 2017). Apesar disso, ainda não há evidências conclusivas do efeito prebiótico dos compostos fenólicos, sendo

este um campo de atuação emergente entre especialistas da área (ALVES-SANTOS *et al.*, 2020). Para isso, deve-se estabelecer uma relação entre o consumo de compostos fenólicos, o crescimento de microrganismos alvos probióticos e, os metabólitos gerados. Porém, o efeito prebiótico de cada composto fenólico depende da fonte alimentar e da estrutura química do composto, juntamente com as diferenças na microbiota intestinal, o que torna um grande desafio determinar os efeitos gerados à saúde (ALVES-SANTOS *et al.*, 2020). O potencial da uvaia como agente anti-inflamatório está associado às suas propriedades farmacológicas, atribuídas às altas concentrações de ácido gálico. Lacerda *et al.* (2020) avaliaram o potencial prebiótico de jabuticaba, fruta nativa da Mata Atlântica, que apresenta um alto teor de ácido gálico, assim como a uvaia. Na jabuticaba foram identificados componentes nutricionais com benefícios para a saúde humana.

### 3.2 Probióticos

Os probióticos são microrganismos vivos, que podem oferecer um benefício à saúde do hospedeiro quando administrados em quantidades adequadas. As características probióticas estão associadas a cepas selecionadas de uma determinada espécie-(HILL *et al.*, 2014). Para que um microrganismo seja considerado probiótico, ele deve possuir reconhecimento por sua Presunção Qualificada de Segurança (*Qualified Presumption of Safety* - QPS) pela Autoridade Europeia para a Segurança Alimentar (EFSA), ou possuir o status de GRAS (*Generally Recognized as Safe*) nos Estados Unidos. Já no Brasil, o microrganismo considerado probiótico para uso em alimentos deve ser aprovado pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) seguindo os protocolos da Resolução RDC 241/2018 (BRASIL, 2018).

O aumento da conscientização do consumidor por um estilo de vida mais saudável, abriu uma enorme demanda no mercado por novos alimentos funcionais que oferecem benefícios para a saúde humana (MENEZES *et al.*, 2018). Uma das funções principais dos probióticos é regular o estado natural da microbiota intestinal que tenha sido perturbada por uma dieta inadequada ou algum outro distúrbio. O principal objetivo do consumo de probióticos - independente se via alimentação ou formulações farmacêuticas - é equilibrar tais distúrbios gastrointestinais, promover a saúde, além de atuarem como imunomoduladores e no combate de microrganismos patogênicos (CICHÓNSKA *et al.*, 2022). Os probióticos podem ser consumidos de diversas maneiras, desde alimentos fermentados até em cápsulas ou comprimidos (RANADHEERA *et al.*, 2017).

As bactérias mais utilizadas em alimentos probióticos pertencem aos gêneros *Bifidobacterium* e *Lactobacillus*. Ambos são encontrados na microbiota humana e são considerados benéficos por possuírem características funcionais quando utilizadas isoladamente ou em conjunto. O fato de haver a disponibilidade comercial das mesmas, facilita seu acesso à população (WITSCHINSKI *et al.*, 2018). Dentre os probióticos reconhecidos, *L. rhamnosus* LGG é uma das cepas probióticas mais utilizadas, sendo documentado em vários estudos a comprovação de seus efeitos para a saúde, incluindo a prevenção de infecções gastrointestinais (SEGERS *et al.*, 2014).

### **3.2.1 *Lacticaseibacillus rhamnosus* Gorbach-Goldin (LGG)**

*Lacticaseibacillus rhamnosus* GG (LGG), ATCC 53103 (anteriormente designado como *Lactobacillus rhamnosus* GG), foi originalmente isolado a partir de amostras fecais humanas pelos cientistas Sherwood Gorbach e Barry Goldwin, por isso as letras GG em seu nome. É uma bactéria Gram-positiva e anaeróbia, e foi identificada como uma estirpe com potencial probiótica, inicialmente devido à sua excelente resistência ao ácido gástrico e a bile, e boa capacidade de adesão à camada epitelial intestinal humana (GORBACH, *et al.*, 2017). A aderência à parede intestinal é um dos aspectos a serem considerados para a ação probiótica, podendo ser estudada por diferentes métodos, tais como cultura obtida de biópsia, análises moleculares e microscopia. A adesão de LGG ao epitélio entérico acaba inibindo a adesão de microrganismos patógenos, este processo é conhecido como colonização competitiva, um dos principais fatores implícitos à eficácia de LGG na prevenção de infecções intestinais. LGG possui uma aderência cerca de 10 vezes mais eficiente do que outros probióticos (SEGERS; LEBEER, 2014).

*Lacticaseibacillus rhamnosus* faz parte da microbiota intestinal saudável do ser humano (GORBACH, *et al.*, 2017) e seus benefícios relacionados à prevenção de distúrbios intestinais têm sido amplamente estudados. Mostrou maior tolerância às condições gastrointestinais e melhor taxa de recuperação, quando adicionados em alimentos, em comparação com outros microrganismos probióticos (SEGERS; LEBEER, 2014). Já foi comprovado que LGG é capaz de aderir à mucosa intestinal *in vivo* e permanecer ali aderido mesmo após uma semana da descontinuidade de sua administração via oral (GORBACH, *et al.*, 2017).

LGG produz uma bacteriocina, identificado como um lantibiótico pertencente à família do tipo pediocina (LGG\_02400) e classe II b (LGG\_02391-02392) com atividade antimicrobiana contra bactérias, como por exemplo *Escherichia coli*, *Staphylococcus* spp., *Streptococcus* spp. e *Salmonella* spp. (GORBACH, *et al.*, 2017). Em outro estudo, foi demonstrado que LGG é capaz de inibir o crescimento de *Salmonella* Typhimurium, devido a sua produção de ácido láctico (SPLICHALOVA *et al.*, 2019). Além de quelar fatores importantes de crescimento de *S. Typhimurium*, também aumenta a permeabilidade das membranas Gram-negativas, causando danos na expressão do gene h1A de *Salmonella* Typhimurium, que são denominados genes resistentes a antimicrobianos (GORBACH, *et al.*, 2017).

LGG é uma bactéria ácido láctica amplamente utilizada na fabricação de produtos lácteos fermentados e outros alimentos não fermentados. Esta cepa tem sido muito utilizada em estudos que envolvem a fermentação de diferentes leguminosas e cereais, e os resultados obtidos têm sido satisfatórios para a capacidade de adaptação ao pH do meio sem efeito prejudicial em sua viabilidade ou nas características sensoriais dos produtos finais. A alegação do benefício à saúde tem ligação direta com a dose e período de administração, sendo que a maioria dos estudos recomendam uma faixa  $> 7 \log \text{ UFC g}^{-1}$  (MASIÁ *et al.*, 2020).

### 3.3 Bebidas vegetais

Há anos, os produtos lácteos têm sido utilizados como os principais veículos de entrega de probióticos (SETTA *et al.*, 2020). Porém, existem algumas restrições neste tipo de produto, como o impedimento do consumo por parte de pessoas que possuem restrições alimentares, ou pessoas que não consomem produtos de origem animal por questões éticas e ambientais (ASCHEMANN-WITZEL *et al.*, 2021). Segundo dados de uma pesquisa global realizada em 2019, 40% dos consumidores participantes disseram que tentam limitar o consumo de proteínas de origem animal, devido a preocupações com as alterações climáticas (GFI, 2020). Neste sentido, o público vegetariano e vegano também vêm crescendo muito ao longo dos anos, o que os torna um público-alvo muito atraente para este ramo da indústria de alimentos (PIMENTEL *et al.*, 2021). Portanto, ampliar a gama de produtos não-lácteos probióticos torna-se um importante nicho de mercado.

O mercado mundial de alternativas a produtos lácteos foi avaliado em US\$ 20,50 bilhões em 2020 e deve expandir a uma taxa de crescimento anual composta (CAGR) de 12,5% de 2021 a 2028 (ASCHEMANN-WITZEL *et al.*, 2021). O Brasil Foods Trends - estudo realizado pela Fiesp (Federação das Indústrias do Estado de São Paulo), Governo do Estado de São Paulo e o ITAL (Instituto de Tecnologia de Alimentos), mostrou que a busca por alimentos mais saudáveis será um dos maiores para os próximos 10 anos (BFT, 2020). As bebidas à base de plantas tratadas como análogos ao leite de vaca, lideraram o mercado e representaram uma participação na receita de mais de 67% em 2020 (GVR, 2020). Os principais impulsionadores do boom das bebidas à base de plantas são a crescente popularidade das dietas à base de plantas e a crescente preocupação com o meio ambiente entre os consumidores (MCCLEMENTS *et al.*, 2020).

Com a crescente busca por um estilo de vida mais saudável e com a preocupação com o meio ambiente, as bebidas à base de plantas deixaram de ser consumidas em sua maior parte por pessoas com restrições alimentares, e vêm obtendo uma grande popularidade entre esses novos consumidores. Devido a esse aumento da demanda de produtos alternativos ao leite, o crescimento da produção de alimentos probióticos não lácteos também está aumentando (MCCLEMENTS *et al.*, 2020).

Muitas proteínas vegetais possuem sabores residuais indesejáveis, o que é um motivo de baixa aceitabilidade para alguns consumidores (TAMANG *et al.*, 2016). Neste sentido, a fermentação surge como uma alternativa para a obtenção de um perfil sensorial mais agradável sem o uso de aditivos químicos (VERNI *et al.*, 2020). O processo fermentativo pode melhorar as propriedades organolépticas e resultar em um análogo de laticínio fermentado com maior aceitabilidade pelo consumidor e com o adicional de ser um alimento de rótulo limpo (TAMANG *et al.*, 2016; ALCORTA *et al.*, 2021).

A fermentação de matrizes vegetais é geralmente realizada por meio de quatro etapas principais – a obtenção da bebida à base de plantas; condicionamento para que a bebida atinja a temperatura ideal para o crescimento dos microrganismos; fermentação em condições específicas; e resfriamento a uma temperatura de aproximadamente 4°C. Esse procedimento pode variar dependendo da matéria-prima, do tipo de microrganismo utilizado e das características finais do produto. A fermentação de bebidas à base de plantas é tipicamente mais longa (em torno de 12 a 24h) do que a produção de laticínios fermentados e termina quando o valor de pH está em torno de 4,2 a 4,5 (NAWAZ *et al.*, 2020). A fermentação de bebidas vegetais melhora significativamente suas propriedades nutricionais e promotoras de saúde, pois durante o processo os oligossacarídeos, taninos, inibidores de proteases e ácido

fítico são reduzidos, aumentando a biodisponibilidade de alguns minerais como, cálcio, ferro e zinco (AKEEM *et al.*, 2019). Os ácidos orgânicos produzidos durante a fermentação têm a capacidade de aumentar a absorção de ferro e zinco formando ligantes solúveis. Durante a fermentação de bebidas vegetais, a capacidade antioxidante também é aumentada, tendo como resultado uma atividade anti-radicaís livres (CICHONSKA, *et al.*, 2022).

As bebidas à base de leguminosas têm a composição química mais equilibrada em comparação a outras fontes vegetais, com teores de proteínas similares ao leite, além de apresentarem fibras, vitaminas, e baixo índice glicêmico. A fração proteica de bebidas vegetais a base de leguminosas varia entre cerca de 3,0 e 4,0%, semelhante ao leite de vaca (ou seja, 3,3 a 3,5%), enquanto outros tipos de bebidas à base de cereais e nozes geralmente apresentam uma fração proteica entre 0,1% e 1,0% (QAMAR *et al.*, 2020).

As leguminosas são consideradas alimento básico em diversos países ao redor do mundo. Dentre as variedades mais consumidas estão feijão, fava, grão de bico, ervilha, lentilha, feijão-fradinho, tremoço e soja (CAMPOS-VEGA *et al.*, 2010; KAMBOJ; NANDA, 2018). São adequadas para o cultivo em condições ambientais adversas e em uma ampla variedade de sistemas de cultivo devido aos seus baixos requisitos de insumos, curto período de crescimento e alta capacidade de fixação de nitrogênio (KAMBOJ; NANDA, 2018).

As leguminosas são fontes de carboidratos (30 a 60%), fibra alimentar (9 a 25%) e proteínas (19 a 36%) contendo aminoácidos essenciais, como lisina, leucina e arginina (AVILES-GACIOLA *et al.*, 2018; KAN *et al.*, 2018). Dentre os carboidratos estão presentes os monossacarídeos, oligossacarídeos e polissacarídeos. Nas leguminosas, o amido é a principal fonte de carboidratos disponíveis (22–45% do conteúdo total), seguido pelos oligossacarídeos (1,8–18%) e pela fibra alimentar (4,3–25%). São geralmente pobres em gordura e não contêm colesterol, com um perfil favorável de ácidos graxos insaturados. Elas também são uma boa fonte de minerais como ferro, cálcio, zinco, selênio, magnésio, fósforo, cobre, potássio e vitaminas do grupo B; no entanto, são pobres em vitamina C e vitaminas lipossolúveis. O teor de umidade de todas as leguminosas secas varia entre 9 e 3%, o que as torna adequadas para armazenamento a longo prazo (FERREIRA, 2021).

As proteínas das leguminosas são compostas principalmente por globulinas (70-80%) que são solúveis em soluções salinas. São consideradas proteínas de armazenamento e podem ser classificadas em dois tipos: leguminas (11S, 300–400 kDa) e vicilinas (7S, 150–180 kDa), ambas com atributos funcionais únicos devido ao seu perfil de aminoácidos, tamanho e estrutura diferentes (LAM *et al.*, 2018). A segunda principal fração proteica nas leguminosas são as albuminas (10-20%). São consideradas proteínas metabólicas hidrossolúveis, que

contém maiores concentrações de triptofano, lisina, treonina e metionina, quando comparadas às globulinas. Dentre as proteínas de leguminosas que estão sendo estudadas quanto ao seu potencial de utilização em bebidas vegetais, destaca-se a proteína de ervilha.

### 3.3.1 Proteínas da ervilha

A ervilha é uma matéria-prima amplamente disponível em escala comercial. Contém cerca de 20 a 25% de teor proteico, possuindo propriedades semelhantes à proteína da soja e incluindo uma grande quantidade do aminoácido lisina. Se comparada com a soja, as ervilhas apresentam maior teor de fibra alimentar, minerais e vitamina C, além de menor teor de gordura. As proteínas da ervilha apresentam propriedades funcionais interessantes, como a gelificação ou capacidade emulsificante e espumante em quase todas as faixas de pH. Além disso, tais propriedades são mantidas após o tratamento térmico (QAMAR *et al.*, 2020). O isolado proteico de ervilha é uma importante fonte de proteínas devido ao seu alto perfil nutricional, potencial antioxidante e baixa alergenicidade em comparação com proteínas provenientes de outras leguminosas e cereais (HERTZLER *et al.*, 2020)

A ervilha é um alimento de alto valor nutricional, pois em sua composição centesimal, apresenta teor de proteína de 22,7 g 100 g<sup>-1</sup> de ervilha seca, teor de lipídeos de 1,3 g 100 g<sup>-1</sup> de ervilha seca, teor de carboidratos de 49,4 g 100 g<sup>-1</sup> de ervilha seca, sendo que destes, 15 g são fibras. Destaca-se também como uma boa fonte de vitaminas, tendo como as principais B3 (2,9 mg 100 g<sup>-1</sup> ervilha seca), B6 (0,13 mg 100 g<sup>-1</sup> ervilha seca) e E (1 mg 100 g<sup>-1</sup> ervilha seca). O teor de potássio (1.036 mg 100 g<sup>-1</sup> ervilha seca), fósforo (336 mg 100 g<sup>-1</sup> ervilha seca), magnésio (121 mg 100 g<sup>-1</sup> ervilha seca) e cálcio (61 mg 100 g<sup>-1</sup> ervilha seca) também se destacam (NAIA, 2015). Além disso, devido ao seu teor de compostos fenólicos (taninos e flavonoides), a ervilha é muito reconhecida pelo seu poder antioxidante (AMAROWICZ, 2008).

As proteínas de ervilha possuem ponto isoelétrico (pI)  $\approx$  4,3 e são extraídas de sementes de ervilha, sendo uma das proteínas vegetais mais populares. As proteínas de ervilha apresentam uma alta solubilidade ( $\approx$  80%) em pH distantes de seu pI. Elas são compostas por aproximadamente (65-80%) de globulinas, uma fração de albumina e outra de glutelina. As globulinas são constituídas por leguminas (globulina 11S hexamérica, com massa molar

variando de 350 a 400 kDa), e vicilinas (globulina 7S trimérica, com massa molar de aproximadamente 150 kDa) (DOAN *et al.*, 2019).

Tais fatores fazem da ervilha uma ótima matriz para a produção de bebidas à base de plantas. As proteínas de ervilha contêm altos níveis de lisina, porém, tendem a ser limitantes quando se trata de metionina e triptofano. Consequentemente, o consumo da proteína de ervilha está associado ao consumo em conjunto com grãos e cereais, pois assim conseguem complementar os aminoácidos essenciais em que as proteínas de cereais geralmente são deficientes, como a lisina por exemplo (LAM *et al.*, 2018). Um dos cereais mais utilizados em formulações de bebidas vegetais é o arroz.

### 3.3.2 Proteínas do arroz

O arroz é um alimento básico, muito consumido em diversos países do mundo. É o segundo cereal mais cultivado no mundo, e o principal alimento para mais da metade da população mundial, contando com uma área de aproximadamente 163 milhões de hectares plantados. Graças à crescente conscientização sobre seus benefícios para a saúde, além de apresentar um baixo custo de produção, o arroz vem crescendo cada vez mais no mercado mundial de grãos secos (SATO; REIS, 2020). Neste sentido, o Brasil aparece em 9º lugar como exportador de arroz, e em 10º lugar como maior produtor mundial. Dentre os maiores produtores globais estão países como China, Índia, Bangladesh, Indonésia, Vietnã, Tailândia, Myanmar, Filipinas, Japão e Brasil, único país não asiático. Já entre os maiores exportadores estão: Índia, Tailândia, Vietnã, Paquistão, EUA, China, Myanmar, Camboja, Brasil e Uruguai. E entre os maiores importadores, estão Filipinas, União Europeia, China, Arábia Saudita e Costa do Marfim (USDA, 2020).

Segundo relatos da CONAB, 2021 a área semeada da safra de arroz de 2021/2022 está estimada em 1.703,2 mil hectares, sendo 1.329,5 mil hectares para arroz irrigado e 373,7 mil hectares para arroz de sequeiro, visto que a produtividade para este é estimada em 11,6 milhões de toneladas. No Brasil, a maior região produtora de arroz é o Sul, com 8,93 milhões de toneladas, além de apresentar a melhor produtividade, com 7.835 kg/hectar. O Rio Grande do Sul destaca-se como o maior produtor com 25,6% da área cultivada e 44,5% da produção, seguido pelo estado do Mato Grosso com 16,4% da área e 14,0% da produção (UFRGS, 2022). Os estados de Minas Gerais, Maranhão, Santa Catarina, Goiás, Tocantins, São Paulo e Mato Grosso do Sul aparecem logo atrás, respectivamente. Nos estados do Rio Grande do Sul e Santa Catarina, o sistema de cultivo predominante é o de irrigação por inundação. Já nos outros estados citados anteriormente, o sistema sequeiro é o que predomina (COELHO, 2021)



Os cereais integrais são ótimas fontes de vitaminas, carboidratos, minerais, aminoácidos, ácido fítico, ligninas e alquil resorcinóis, que podem apresentar potenciais efeitos antioxidantes. Também são ricos em fibras solúveis ( $\beta$ -glucanos e pentosanos, como arabinoxilano) e insolúveis (lignina, celulose e hemicelulose). Porém, apresentam alguns desafios do ponto de vista nutricional, como uma quantidade limitada de proteína e um perfil incompleto de aminoácidos essenciais, e também a presença de compostos antinutricionais (fitatos e taninos) (BERNARDO, 2021).

O arroz possui sabor levemente adocicado e suave, tornando-se uma boa opção para a obtenção de produtos a partir de seu extrato (JAEKEL *et al.*, 2010). A qualidade nutricional de sua proteína é avaliada como equivalente ou superior à de outros cereais, porém é significativamente menor que às proteínas derivadas de leguminosas/oleaginosas (ZHAO *et al.*, 2020). As proteínas do arroz podem ser classificadas em albumina, globulina, prolamina e glutelina, e estão divididas em dois tipos de corpos proteicos no endosperma. Os corpos proteicos I são grandes estruturas esféricas, ricos em prolaminas que constituem 80% da proteína do endosperma. Os corpos proteicos II são ricos em glutenina e globulina que correspondem a 15% e as prolaminas com 5-8% de proteínas. O farelo de arroz apresenta cerca de 60% de albumina em sua composição, seguido por prolamina e glutelina 27% e globulina 7% (HOOGENKAMP *et al.*, 2017). As proteínas do arroz são fonte de aminoácidos sulfurados, como metionina e cistina, e sua co-utilização com proteínas de ervilha complementa a formulação, deixando o produto com um perfil aminoácidos essenciais mais completo (ZHAO *et al.*, 2020).

Numa bebida contendo a combinação de proteína de arroz e proteína de ervilha, é possível obter todos os aminoácidos essenciais ao ser humano (Fenilalanina, Histidina, Isoleucina, Leucina, Lisina, Metionina, Treonina, Triptofano e Valina).

## 4. MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1 Material

Uma cultura probiótica liofilizada composta por *Lactocaseibacillus rhamnosus* LGG® (Lr) (Chr. Hansen, Hønsholm, Dinamarca) foi usada como material ativo para a incorporação na bebida vegetal. Proteína isolada de arroz (80,00 g proteína 100 g<sup>-1</sup>) (VeganWay, Florianópolis, SC, Brasil) e proteína isolada de ervilha (80,00 g proteína 100 g<sup>-1</sup>) (VeganWay, Florianópolis, SC, Brasil) foram usadas para a fabricação das bebidas. O experimento foi realizado com polpa de uvaia (*Eugenia pyriformis*) (89,4% de umidade, 1,0% de proteína, 0,25% de gordura, 9,05% de carboidratos e 0,30% cinzas). Caldo MRS e Ágar MRS (Kasvi, São José dos Pinhais, PR, Brasil) foram usados para o crescimento bacteriano. As enzimas  $\alpha$ -amilase (28,75 U mg<sup>-1</sup> de proteína), pepsina de mucosa gástrica suína (400 U mg<sup>-1</sup> de proteína), pancreatina de pâncreas suíno (poder digestivo – 8  $\times$  especificações USP) e os sais biliares bovinos foram fornecidos pela Sigma-Aldrich (São Paulo, SP, Brasil). Para determinar a viabilidade das bactérias probióticas, foi utilizado o Kit BacTiter-Glo™ Viability adquirido da Promega (Madison, WI, EUA). Todos os produtos químicos eram de grau analítico ou com pureza equivalente.

### 4.2 Preparação da suspensão probiótica

A solução estoque de *L. rhamnosus* GG® foi adicionada em caldo MRS e submetida a um período de incubação a 37°C  $\pm$  1 por 48 h. Após o período de incubação, as células probióticas foram centrifugadas (4000  $\times$  g) por 10 min (Centrifuge-SL 700 da Solab, Piracicaba, SP, Brasil) em temperatura de 25°C  $\pm$  1 e lavadas três vezes com solução salina (0,85 g 100 mL<sup>-1</sup>). O pellet foi mantido em refrigeração até o momento do uso.

### 4.3 Preparação da bebida vegetal fermentada

A formulação da bebida vegetal foi adaptada de ZHAO *et al.* (2020) e PUA *et al.* (2022) e continha 100 mL de água, 1,83 % (m/v) de proteína de arroz, 1,83 % (m/v) de proteína de ervilha, 10 % (m/v) de sacarose, 0,32 % (m/v) de óleo de soja e 0,2 % (m/v) de lecitina de soja. A mistura foi homogeneizada com o auxílio de Ultra-Turrax (IKA™ T25 digital) por 3 minutos. Após resfriamento até 37°C foi adicionada de *L. rhamnosus* GG seguida de incubação

a  $37^{\circ}\text{C} \pm 2$  até alcançar o pH de 4,8. Após a fermentação, a bebida foi resfriada à  $4^{\circ}\text{C}$ . Após o resfriamento, a polpa de uvaia tratada termicamente ( $80^{\circ}\text{C}/3\text{min}$ ) foi adicionada à bebida fermentada nas seguintes proporções: sem a polpa de uvaia (controle), bebida com 5% (m/v) de polpa de uvaia e bebida com adição de 10% (m/v) de polpa de uvaia. As bebidas foram mantidas sob refrigeração ( $4^{\circ}\text{C} \pm 1$ ) até o momento das análises.

#### 4.4 Simulação gastrointestinal *in vitro*

O potencial prebiótico da polpa de uvaia foi avaliado através da sobrevivência de *L. rhamnosus* GG durante a passagem pelo sistema gastrointestinal *in vitro*. Utilizou-se 5 g de cada amostra para avaliar a sobrevivência bacteriana ao longo das fases oral, fase gástrica e fase ileal, utilizando o protocolo descrito por BRODKORB *et al.* (2019). Todo o ensaio foi conduzido a  $37^{\circ}\text{C} \pm 1$ , bem como foi utilizada agitação orbital com o objetivo de simular a temperatura corpórea e os movimentos peristálticos. Em detalhes, na fase oral a amostra foi homogeneizada na proporção 1:1 (m/m) com fluido salivar simulado (SSF) (Tabela 1). Esta mistura foi então adicionada de  $\alpha$ -amilase salivar (75 U/mL) e agitada por 2 min a 150 rpm. Na fase gástrica, o bolo oral foi adicionado de fluido gástrico simulado (SGF) (Tabela 1) até atingir uma proporção final de 1:1 (v/v). Foi utilizada pepsina na concentração de 2000 U/mL, bem como o pH desta fase foi ajustado para 3,0 utilizando HCl 1 M. As amostras foram incubadas por 2h com agitação de 45rpm. Na fase ileal, o quimo gástrico foi adicionado de fluido intestinal simulado (SIF) (Tabela 1) até atingir uma proporção final de 1:1 (v/v). O pH foi ajustado para 7,0 com solução de NaOH 1 M, seguido da adição da 10mM, sais de bile e pancreatina (100 U/mL baseada na atividade da tripsina). A incubação da fase intestinal levou 2h adicionais à 45rpm. Após passar pelo intestino delgado, as bactérias chegam à etapa do intestino grosso, onde o ensaio foi adaptado para simular as condições do cólon (Verruck *et al.*, 2019). O fluido do intestino grosso simulado (SLF) (Tabela 1) foi adicionado ao bolo ileal na proporção de 1:1 (v/v). O pH foi ajustado para 7,0 com solução de NaOH 1 M durante todo o tempo do ensaio das condições do intestino grosso. Durante essa etapa, a temperatura foi mantida em  $37 \pm 1^{\circ}\text{C}$ , e a agitação também foi mantida a 45 rpm para simular a intensidade dos movimentos peristálticos. A quantificação de *L. rhamnosus* GG foi realizada antes da simulação gastrointestinal, durante a fase oral, gástrica, ileal e durante a simulação do intestino grosso nos tempos de 6, 12, 18, 24, 30, 36, 42 e 48 h. Após cada etapa da simulação gastrointestinal, o volume resultante das fases aumentou (assim como ocorre naturalmente), então, a diluição foi corrigida para a avaliação da concentração microbiana.

**Tabela 1.** Concentrações dos fluídos utilizados nas etapas de simulação gastrointestinal.

Concentrações (g/L) (M)				
	SSF pH 7	SGF pH 3	SIF pH 7	SLF pH 7
KCl	15,10	6,90	6,80	4,50
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	3,70	0,90	0,80	0,50
NaHCO <sub>3</sub>	13,60	25,00	85,00	1,50
NaCl	-	47,20	38,4	-
MgCl <sub>2</sub> (H <sub>2</sub> O) 6	0,15	0,12	0,33	-
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	0,06	0,50	-	-
HCl	1,10	15,60	8,40	-
CaCl <sub>2</sub> (H <sub>2</sub> O) <sub>2</sub>	1,50	0,15	0,60	0,15
Peptona	-	-	-	5,00
Extrato de Levedura	-	-	-	4,50
NaCl	-	-	-	4,50
MgSO <sub>4</sub>	-	-	-	1,25
FeSO <sub>4</sub>	-	-	-	0,005
Amido	-	-	-	5,00
Pectina	-	-	-	2,00
Caseína	-	-	-	3,00
Cisteína	-	-	-	0,8
Tween 80	-	-	-	1,00
Triptona de Soja	-	-	-	5,00

SSF: Fluido salivar simulado; SGF: Fluido gástrico simulado; SIF: Fluido intestinal simulado; SLF: Fluido do intestino grosso simulado.

#### 4.5 Quantificação de *L. rhamnosus* GG

Para quantificar o número de células viáveis de *L. rhamnosus* GG em cada etapa da simulação gastrointestinal foi utilizado o método de bioluminescência. Para isto, a curva de calibração ( $R^2 = 0,9925$ ) foi construída através da correlação dos valores de luminescência com as contagens em placa. Resumidamente, foi realizado a diluição em série da cultura pura de *L. rhamnosus* GG em solução salina ( $0,85 \text{ g } 100 \text{ mL}^{-1}$ ), e em seguida,  $100 \mu\text{L}$  de cada diluição foi misturados com  $50 \mu\text{L}$  do reagente BacTiter-Glo™ e submetidos a um leitor de microplacas da Promega (GloMax® Explorer System modelo GM3500, EUA) para a obtenção dos valores de luminescência. Por sua vez, as contagens em placa foram obtidas através do método *pour plate* em ágar de Man, Rogosa e Sharp (MRS). As placas foram incubadas em estufa bacteriológica a  $37 \pm 1^\circ\text{C}$  por 48 h e a contagem de células viáveis de *L. rhamnosus* GG expressa em log de unidades formadoras de colônias por grama ( $\log \text{ UFC g}^{-1}$ ). Para quantificar o número de células viáveis das bebidas submetidas à simulação gastrointestinal foram misturados  $100 \mu\text{L}$  de cada amostra com  $50 \mu\text{L}$  de reagente BacTiter-Glo™ e submetidos a um leitor de microplacas da Promega (GloMax® Explorer System modelo GM3500, EUA). Os resultados foram expressos como log de unidades formadoras de colônia -por grama ( $\log \text{ UFC g}^{-1}$ ). Todos os experimentos foram realizados em triplicata, incluindo a propagação da bactéria probiótica para a construção da curva.

O desempenho de *L. rhamnosus* GG durante as etapas gastrointestinais *in vitro* também foi avaliado pela taxa de recuperação (%) (Verruck *et al.*, 2017) segundo a equação:

$$\text{Taxa de recuperação} = \frac{\log \text{ UFC } N_1}{\log \text{ UFC } N_0} \times 100 (\%)$$

onde  $N_1$  é a contagem de exposição de células viáveis de *L. rhamnosus* GG ( $\log \text{ UFC g}^{-1}$ ) após a exposição a cada etapa gastrointestinal *in vitro*, e  $N_0$  é a contagem de células viáveis de *L. rhamnosus* GG ( $\log \text{ UFC g}^{-1}$ ) inicial, antes da passagem pelo sistema gastrointestinal *in vitro*.

#### 4.6 Análise Estatística

Para a determinação de diferenças significativas ( $p < 0,05$ ) entre os resultados, utilizou-se análise de variância (ANOVA) one-way e teste de Tukey. Todas as análises estatísticas

foram realizadas usando Statistica versão 13.3 (TIBCO Software Inc., Palo Alto, CA). Os dados foram expressos como média  $\pm$  desvio padrão.

## 5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

A contagem de células viáveis e a taxa de recuperação de *L. rhamnosus* GG nas amostras após a exposição às fases oral, gástrica e intestinal (ileal) são mostradas na Tabela 2 e na Figura 1, respectivamente. Apesar de haver diferença ( $p < 0,05$ ) entre as contagens iniciais de *L. rhamnosus* GG da amostra controle para as amostras adicionadas de polpa de uvaia (Tabela 2), esta variação foi de apenas 0,14 e 0,15 log UFC g<sup>-1</sup>, o que pode ser considerado como microbiologicamente não relevante (PINTO *et al.*, 2015). Além disso, todas as amostras apresentaram alta contagem de células viáveis ( $> 9$  log UFC g<sup>-1</sup>) ao final da fermentação da bebida vegetal fermentada, apresentando esta matriz como uma nova fonte potencial de carregamento de probióticos. Embora não haja um consenso na literatura sobre a quantidade mínima de microrganismos probióticos necessária para proporcionar efeitos benéficos ao organismo (MARTINS *et al.*, 2016), alguns autores consideram um valor  $>6$  log UFC g<sup>-1</sup> ou mL<sup>-1</sup> do alimento (HUSSAIN *et al.*, 2016), enquanto outros consideram entre 6 e 7 log UFC g<sup>-1</sup> (MADUREIRA *et al.*, 2011), ou 9 a 10 log UFC g<sup>-1</sup> (HAY *et al.*, 2016). Este consenso não é generalizado pois a atividade probiótica é dose-cepa específica (HILL *et al.*, 2014). Para *L. rhamnosus* GG, estudos clínicos comprovam que a cepa coloniza significativamente melhor o intestino de recém-nascidos em comparação com adultos, visto que a suplementação pré-natal com *L. rhamnosus* GG  $> 10$  log UFC mL<sup>-1</sup> altera a composição da microbiota dos neonatos, promovendo um perfil benéfico dominado por bifidobactérias (MARTÍN-PELÁEZ *et al.*, 2022). Além disso, a ingestão diária de *L. rhamnosus* GG  $> 9$  log UFC mL<sup>-1</sup> em crianças hospitalizadas reduziu o risco de infecções gastrointestinais (CRUCHET *et al.*, 2015). Já em adultos hipersensíveis ao leite, a ingestão diária de leite juntamente com *L. rhamnosus* GG  $> 8$  log UFC mL<sup>-1</sup> demonstrou reduzir a resposta imunoinflamatória ao reduzir a expressão de receptores específicos (SEGERS *et al.*, 2014). Tomados em conjunto, os ensaios clínicos relacionados a *L. rhamnosus* GG recomendam doses diárias acima de 8 log UFC mL<sup>-1</sup>, para que os efeitos benéficos sejam observados (SEGERS; LEBEER, 2014), valores estes que a matriz estudada neste estudo alcançou, podendo ser considerada probiótica (Tabela 2).

**Tabela 2.** Contagens de células viáveis (log UFC g<sup>-1</sup>) de *L. rhamnosus* após a simulação das condições gastrointestinais *in vitro*.

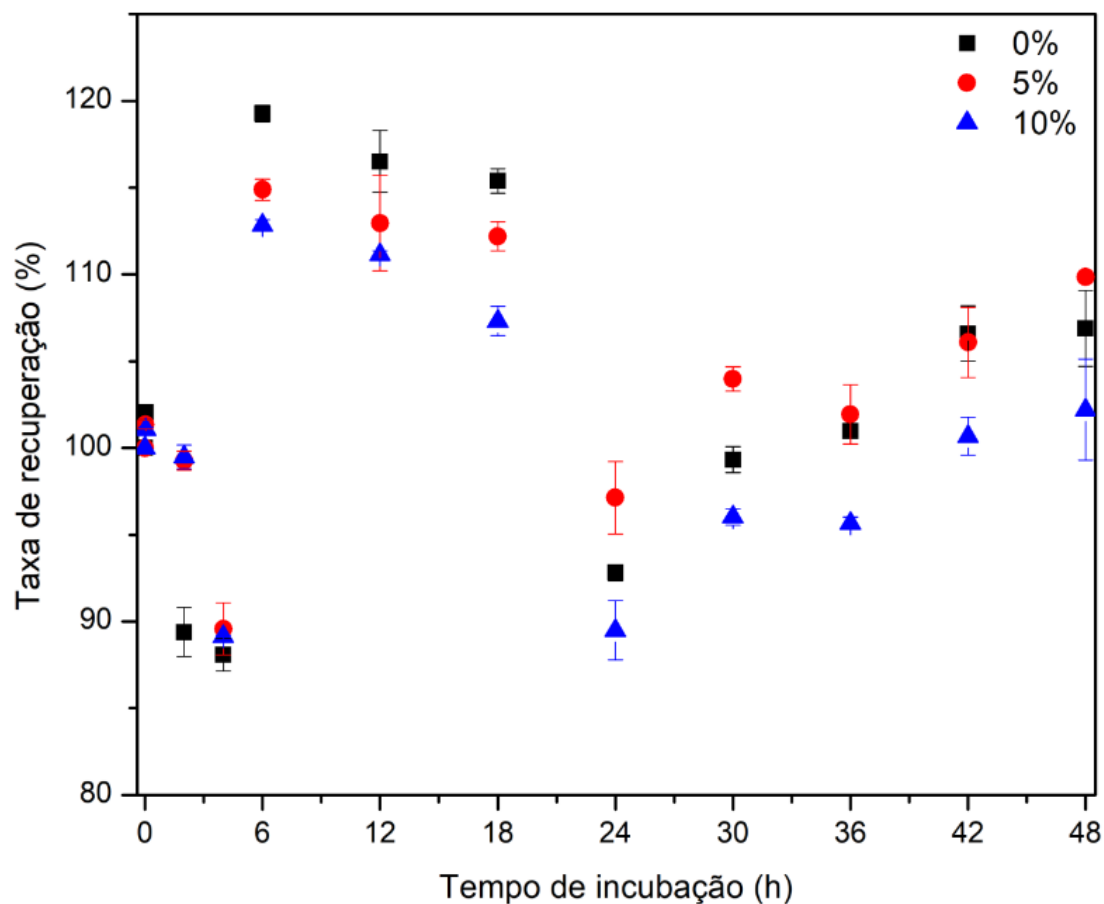
Etapa	Amostra		
	0%	5%	10%
Inicial	9,30 <sup>b, DE</sup> ± 0,03	9,44 <sup>a, FG</sup> ± 0,01	9,45 <sup>a, C</sup> ± 0,04
Boca	9,49 <sup>b, EF</sup> ± 0,04	9,57 <sup>a, EF</sup> ± 0,02	9,55 <sup>ab, C</sup> ± 0,01
Estômago	8,31 <sup>b, G</sup> ± 0,13	9,37 <sup>a, FG</sup> ± 0,05	9,40 <sup>a, C</sup> ± 0,07
Íleo	8,19 <sup>b, G</sup> ± 0,09	8,49 <sup>a, H</sup> ± 0,14	8,42 <sup>ab, C</sup> ± 0,01
6 h	11,09 <sup>a, A</sup> ± 0,04	10,79 <sup>b, AB</sup> ± 0,10	10,66 <sup>b, A</sup> ± 0,03
12 h	10,84 <sup>a, A</sup> ± 0,17	11,04 <sup>a, A</sup> ± 0,04	10,50 <sup>b, A</sup> ± 0,02
18 h	10,73 <sup>a, AB</sup> ± 0,07	10,59 <sup>a, BC</sup> ± 0,08	10,50 <sup>b, B</sup> ± 0,02
Cólon	8,63 <sup>b, FG</sup> ± 0,03	9,17 <sup>a, G</sup> ± 0,16	8,46 <sup>b, E</sup> ± 0,13
30 h	9,24 <sup>b, DEF</sup> ± 0,07	9,82 <sup>a, DE</sup> ± 0,07	9,07 <sup>b, D</sup> ± 0,04
36 h	9,39 <sup>a, CDE</sup> ± 0,02	9,62 <sup>a, EF</sup> ± 0,16	9,04 <sup>b, D</sup> ± 0,03
42 h	9,91 <sup>a, CD</sup> ± 0,15	10,01 <sup>a, D</sup> ± 0,19	9,51 <sup>a, C</sup> ± 0,10
48 h	9,94 <sup>ab, BC</sup> ± 0,02	10,37 <sup>a, C</sup> ± 0,03	9,66 <sup>b, C</sup> ± 0,28

Resultados expressos em média ± desvio padrão.

<sup>a-d</sup> Na mesma linha, diferentes letras minúsculas sobrescritas denotam diferenças significativas ( $p < 0,05$ ) entre as amostras para a mesma etapa gastrointestinal simulada.

<sup>A-D</sup> Na mesma coluna, diferentes letras maiúsculas sobrescritas denotam diferenças significativas ( $p < 0,05$ ) entre as diferentes etapas das condições gastrointestinais simuladas para cada amostra.

**Figura 2.** Taxa de recuperação (%) de *L. rhamnosus* GG durante a simulação das condições gastrointestinais *in vitro*. Fase oral (2min), Fase gástrica (2h), Fase ileal (4h), Fase intestinal (6h – 48h). Amostra controle (■); Amostra com 5% de polpa de uvaia (●); e amostra com 10% de polpa de uvaia (▲).



Fonte: A autora.

Em comparação com a etapa inicial, quando expostas às condições da boca (SSF), não houve diferença significativa na contagem de células viáveis e taxa de recuperação de *L. rhamnosus* GG nas amostras (Tabela 2 e Figura 1, respectivamente). A hidrólise do alimento pela ação da enzima  $\alpha$ -amilase, presente na saliva, acontece de forma gradual (Humphrey & Williamson, 2001). Por apresentar característica líquida e pouco viscosa, a bebida vegetal fica pouco tempo em contato com as condições orais, o que provavelmente acabou não afetando a recuperação de *L. rhamnosus* GG. Por outro lado, a bactéria probiótica deve ser capaz de tolerar o baixo pH estomacal para por fim colonizar o epitélio intestinal. Durante a passagem pelo estômago (SGF), houve redução ( $p < 0,05$ ) na contagem de células viáveis e na taxa de



recuperação de *L. rhamnosus* GG na amostra controle (sem adição de polpa de uvaia). Este comportamento pode estar relacionado à formação de complexos/aglomerados insolúveis entre proteínas e polissacarídeos que podem criar uma barreira protetora, impedindo que a pepsina e os fluidos gástricos atinjam as células bacterianas. Quando as proteínas de ervilha e de arroz estão em um meio abaixo de seu pI (4,6 a 4,8) (KORNET et al., 2021; LAN; CHEN; RAO, 2018; ZHANG et al., 2021), elas terão uma carga líquida positiva, interagindo com polissacarídeos aniônicos (por exemplo, a pectina que pode estar presente na polpa) formando o complexo (MUN; SURH; SHIN, 2020). Embora o suco gástrico (pH 3,0) e a pepsina sejam altamente prejudiciais ao probiótico, a contagem de células viáveis e a taxa de recuperação permaneceram acima de 8 log UFC g<sup>-1</sup> e 89 % após esta etapa para todas as amostras, respectivamente. A manutenção de altas contagens viáveis e taxa de recuperação das amostras nesta fase também pode estar relacionada à presença de ácidos orgânicos oriundos da polpa de uvaia, o que pode ter induzido uma maior resistência à cepa nas condições gástricas (PERRICONE et al., 2015). Koponen et al. (2012) descrevem que a exposição à estresse ácido sub-letal, como durante a fermentação e com o uso de polpa de frutas, pode induzir resistência a um estresse subsequente por meio da ativação de sistema de proteção de *L. rhamnosus* GG, como a produção de uma ATPase translocadora de prótons (F<sub>0</sub>F<sub>1</sub>-ATPase) e expressão do fator  $\sigma^A$  para manter a homeostase do pH citoplasmático. Além disso, o ácido gálico (presente na polpa de uvaia) tem sido relacionado à uma adaptação metabólica específica em cepas de *Lactobacillus* spp. (REVERON et al., 2015). As medidas de potencial de membrana e pH interno mostraram que o processo de transporte e os íons H<sup>+</sup> consumidos durante a descarboxilação do ácido gálico pela galato descarboxilase de *L. plantarum*, aumentaram a força próton-motriz sobre a membrana celular e o pH intracelular reduzindo assim o estresse ácido (REVERON et al., 2015).

A seguir, as amostras foram expostas às condições gastrointestinais simuladas do íleo, portanto, foram expostas aos sais biliares e à pancreatina, sob condições de pH igual a 7,0 (SIF). Nesta etapa, a taxa de recuperação de *L. rhamnosus* GG diminuiu ( $p < 0,05$ ) nas amostras adicionadas de 5% e 10% de polpa de uvaia. Nazo et al. (2019) observaram que os sais biliares podem atuar com ação detergente sobre as membranas celulares, podendo ser responsável por tal diminuição da taxa de recuperação. Como observado por Tesoriere et al. (2016) durante esta etapa, as enzimas adicionadas, juntamente com os sais biliares, tiveram tempo de atuar sobre a membrana de peptidoglicanos nas células microbianas. Adicionalmente, a hidrólise proteica causada pela ação do suco pancreático (pancreatina e sais biliares) pode ter causado a liberação dos microrganismos que estavam aderidos a eles, deixando-os mais vulneráveis a sua

ação. Por outro lado, durante esta etapa, mesmo com o decréscimo das células viáveis, elas permaneceram  $> 8 \log \text{UFC}^{-1}$  em todas as amostras, mostrando uma excelente capacidade de resistência. Vale ressaltar que as culturas probióticas adicionadas aos alimentos devem permanecer viáveis e em altas concentrações, desde a inoculação até o fim da vida útil do produto, de modo que sobrevivam às condições do trato gastrointestinal e apresentem-se em altas concentrações na etapa intestinal (FURTADO *et al.*, 2019), comportamento este observado para todas as amostras deste estudo.

Ao chegarem no intestino grosso, devido à baixa acidez, bem como grande quantidade de substratos disponíveis e não absorvidos anteriormente, os microrganismos podem se multiplicar e então exercer seus efeitos benéficos (VERRUCK *et al.*, 2019). A multiplicação expressiva de *L. rhamnosus* GG foi observada até às 18h sob condições do intestino grosso simuladas (Tabela 2 e Figura 2). Nesta etapa foi adicionado o fluido simulado do intestino grosso (SLF) que continha todos os nutrientes que naturalmente estariam presentes no cólon humano, além daqueles que já faziam parte naturalmente da bebida, o que explica o melhor desempenho da contagem de células viáveis e taxa de recuperação. As bactérias do gênero *Lactobacillus* ssp. possuem a capacidade de hidrolisar proteínas gerando peptídeos e aminoácidos que possuem melhor e mais eficiente absorção em comparação com uma proteína nativa (ALLAHDAD *et al.*, 2022). O tempo de fermentação gera impactos nas propriedades físico-químicas e sensoriais do produto, além disso, a hidrólise de proteínas durante a fermentação também pode melhorar sua digestibilidade, sua absorção e utilização pela microbiota intestinal como fonte de substrato. Além disso, grande parte dos compostos fenólicos da dieta chegam ao cólon intactos, podendo ser fonte de substratos para a microbiota intestinal, sendo reconhecidos como prebióticos (KAWABATA *et al.*, 2019). Os prebióticos são fermentados pela microbiota do cólon, multiplicando as bactérias benéficas dos gêneros *Bifidobacterium* e *Lactobacillus*. Durante a fermentação, ocorre a produção de uma mistura de ácidos graxos de cadeia curta, como acetato, propionato e butirato, L-lactato (JOHNSON *et al.*, 2020). Esses compostos são responsáveis por fornecer uma vasta gama de benefícios fisiológicos, incluindo regulação anti-inflamatória e imunológica, propriedades anticancerígenas e regulação metabólica. Os mecanismos de ação dos prebióticos podem ser indiretos, responsável pelo fornecimento de nutrientes a microbiota intestinal para um crescimento natural, ou podem atuar de forma direta, inibindo algumas bactérias patogênicas, eliminando colesterol e no controle de doenças cardiovasculares (MOHANTY *et al.*, 2018). O efeito prebiótico observado para esses compostos pode estar relacionado à presença de flavonoides glicosilados, que servem como fonte de carbono e energia para alguns

microrganismos da microbiota intestinal, e que fermentam os açúcares ligados a esses flavonoides (BRAUNE; BLAUT, 2016). A presença de oligossacarídeos, amido resistente, compostos fenólicos e isoflavonas nas leguminosas, as tornam potenciais substratos para bactérias probióticas. Tais propriedades permitem que sejam utilizadas para o potencial desenvolvimento de alimentos simbióticos, fontes de probióticos e prebióticos (CICHONSKA et al., 2022). No entanto, apesar da literatura descrever alguns compostos fenólicos como potenciais prebióticos, nas condições analisadas neste estudo, esta ação não se sobressaiu à matriz testada (controle).

No intervalo entre 24h e 36h houve um decréscimo de células viáveis e na taxa de recuperação (Tabela 2 e Figura 1, respectivamente), possivelmente pela necessidade de adaptação para o consumo de substratos não tão facilmente disponíveis, como proteínas de alta MM e frutooligossacarídeos. Além disso, após às 18h de incubação, a amostra com 10% de polpa de uvaia apresentou menor taxa de recuperação ( $p > 0,05$ ) em relação as demais amostras. Possivelmente este comportamento tem relação com a maior concentração de polpa de uvaia nesta amostra, que pode ter liberado uma grande quantidade de compostos fenólicos durante a fermentação intestinal, levando à inibição do crescimento da bactéria probiótica. Nualkaekul e Charalampopoulos (2011), ao estudar a recuperação de *L. plantarum* em algumas frutas, notaram uma perda considerável na viabilidade desta bactéria, possivelmente devido ao alto teor de compostos fenólicos liberados pelos sucos de romã e cranberry.

Ao final da fase intestinal, após as 48h de fermentação, que é o tempo médio de passagem pelo intestino grosso de um alimento em um ser humano saudável, todas as contagens apresentavam-se elevadas ( $> 9 \log \text{ UFC g}^{-1}$ ). Estes resultados indicam que independente da adição de polpa de uvaia ou não, esta matriz vegetal apresenta-se como uma alternativa promissora para o carreamento de *L. rhamnosus* GG. No entanto, as amostras controle e com 5% de polpa de uvaia apresentaram maior contagem de células viáveis ao final da fase intestinal em comparação à amostra adicionada de 10% de polpa de uvaia. Durante a multiplicação das células probióticas, principalmente na etapa do cólon, os compostos fenólicos na forma de polímeros e oligômeros, podem ser hidrolisados e transformados em formas mais ativas (FELIPE et al., 2022). Apesar de estarem recentemente sendo relacionados à atividade prebiótica, os compostos fenólicos têm amplo reconhecimento como moléculas antioxidantes e antimicrobianas (FARIAS et al., 2020). Os antimicrobianos geralmente apresentam a superprodução de espécies reativas de oxigênio (ROS) para exercer sua atividade, portanto, o estresse oxidativo pode estar na base da ação antimicrobiana dos compostos fenólicos (FELIPE et al., 2022). Devido às suas propriedades antimicrobianas, os compostos fenólicos podem

exercer amplos efeitos sobre os microrganismos resultando em mudanças dinâmicas na microbiota intestinal, comumente resultando em alteração da relação *Firmicutes* para *Bacteroidetes* (ESPÍN *et al.*, 2017). Portanto, o conhecimento das bases que governam as interações recíprocas entre compostos fenólicos-microbiota é importante para entender como estes moldam as comunidades microbianas do hospedeiro, bem como esse conhecimento é necessário para decifrar as vias bioquímicas que as bactérias, no contexto de simbiose com seus hospedeiros, evoluíram para metabolizar compostos fenólicos e fornecer esses compostos em suas formas biodisponíveis e bioativas (FELIPE *et al.*, 2022). Sendo assim, a maior concentração de polpa de uvaia testada (10%) neste estudo pode não ser a melhor opção para carrear *L. rhamnosus* GG em bebida vegetal.

## 6. CONCLUSÃO

Todas as amostras apresentaram altas concentrações de células viáveis e foram possíveis de serem consideradas probióticas ( $> 9 \log \text{ UFC g}^{-1}$ ). As altas contagens de células viáveis permaneceram durante toda a passagem pelo sistema gastrointestinal, mesmo na etapa do íleo, onde efetivamente tem maior potencial de ação probiótica. Ao final da fase intestinal, a amostra controle e com 5% de polpa de uvaia apresentaram maior contagem de células viáveis em comparação à amostra adicionada de 10% de polpa de uvaia. Sendo assim, a adição de 10% de polpa de uvaia em bebida vegetal não é recomendada devido a atividade inibitória apresentada frente ao *L. rhamnosus* GG. No entanto, todas as contagens apresentavam-se elevadas ( $> 9 \log \text{ UFC g}^{-1}$ ), indicando que independente da adição de polpa de uvaia ou não, esta matriz vegetal apresenta-se como uma alternativa promissora para o carreamento de *L. rhamnosus* GG.

## REFERÊNCIAS

BRASIL. **Agência Nacional de Vigilância Sanitária**. Resolução nº 243, de 26 de julho de 2018. Requisitos sanitários dos suplementos alimentares. Diário Oficial da União, Brasília, 26 de jul. 2018. n. 144. Disponível em < [http://antigo.anvisa.gov.br/documents/10181/3898888/RDC\\_243\\_2018\\_.pdf/0e39ed31-1da2-4456-8f4a-afb7a6340c15](http://antigo.anvisa.gov.br/documents/10181/3898888/RDC_243_2018_.pdf/0e39ed31-1da2-4456-8f4a-afb7a6340c15) > Acesso em: 13 junho 2022.

ALANDER, M. *et al.* Persistence of colonization of human colonic mucosa by a probiotic strain, *Lactobacillus rhamnosus* GG, after oral consumption. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, USA, v. 65, n. 1, p. 351-354, 1999.

ALCORTA, A. *et al.*, Foods for plant-based diets: Challenges and innovations. In *Foods* (Vol. 10, Issue 2) (2021). **MDPI Multidisciplinary Digital Publishing Institute**. <https://doi.org/10.3390/foods10020293>

ALLAHDAD, Z. *et al.* Physico-chemical Properties and Sensorial Appreciation of a New Fermented Probiotic Beverage Enriched with Pea and Rice Proteins. **Plant Foods for Human Nutrition**, v. 77, n. 1, p. 112–120, 2022.

ASCHEMANN-WITZEL, J. *et al.* Plant-based food and protein trend from a business perspective: markets, consumers, and the challenges and opportunities in the future. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 61, n. 18, p. 3119–3128, 2021.

AVILES-GACIOLA, S. *et al.* Inactivation Methods of Trypsin Inhibitor in Legumes: A Review. **Journal of Food Science**, 2018, 83, 17–29. <https://doi.org/10.1111/1750-3841.13985>

BIANCHINI, C. B. *et al.* Incorporation of uvaia (*Eugenia pyriformis* Cambess) pulp in yogurt: A promising application in the lactose-free dairy product market. **Journal of Food Processing and Preservation**, v. 44, n. 10, 2020.

BRODKORB, A. *et al.* INFOGEST static in vitro simulation of gastrointestinal food digestion. **Nature Protocols**, v. 14, n. 4, p. 991–1014, 2019.

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, p. 121–129, 2010.

CAMPOS-VEGA, R. *et al.*, Minor components of pulses and their potential impact on human health. **Food Research International**. 2010, 43, 461–482.  
<https://doi.org/10.1016/j.foodres.2009.09.004>

CARVALHO, T. W. *et al.* Características físico-químicas de extratos de arroz integral, quirera de arroz e soja. **Pesquisa Agropecuária Tropical**, Goiânia, v. 41, n. 3, p. 422-429, 2011.

CHAMPAGNE, C. P. *et al.* Strategies to improve the functionality of probiotics in supplements and foods. **Current Opinion in Food Science**, v. 22, p. 160-166, 2018.

CICHOŃSKA, P.; ZIARNO, M. Legumes and legume-based beverages fermented with lactic acid bacteria as a potential carrier of probiotics and prebiotics. **Microorganisms MDPI - Multidisciplinary Digital Publishing Institute** 2022.

COÊLHO, J. D. Arroz: Produção e mercado. **Caderno Setorial ETENE**, v. 156, n. 6, p. 1–7, 2021. Disponível em: <[https://www.bnb.gov.br/s482-dspace/bitstream/123456789/698/1/2021\\_CDS\\_156.pdf](https://www.bnb.gov.br/s482-dspace/bitstream/123456789/698/1/2021_CDS_156.pdf)> . Acesso em: 05 de junho de 2022.

CRUCHET, S. *et al.* The use of probiotics in pediatric gastroenterology: a review of the literature and recommendations by latin-american experts. **Pediatric Drugs**, v. 17, n. 3, p. 199–216, 2015.

ESPÍN, J. C. *et al.* The gut microbiota: A key factor in the therapeutic effects of (poly)phenols. **Biochemical Pharmacology**, v. 139, p. 82–93, 2017.

FAO – Food and Agriculture Organization of the United Nations. **Statistical databases**. Disponível em: <http://www.fao.org>. Acesso em: 05 de junho de 2022.

FARIAS, D. *et al.* A critical review of some fruit trees from the Myrtaceae family as promising sources for food applications with functional claims. **Food Chemistry**, v. 306, p. 125630, 15 fev. 2020.

FELIPE, F. *et al.*, Molecular Responses of Lactobacilli to Plant Phenolic Compounds: A Comparative Review of the Mechanisms Involved. **Antioxidants**, 11(1). (2022) <https://doi.org/10.3390/antiox11010018>

FERREIRA, H. *et al.* Benefits of pulse consumption on metabolism and health: A systematic review of randomized controlled trials. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**. 2021, 61, 85–96. <https://doi.org/10.1080/10408398.2020.1716680>

FURTADO, L. L. *et al.* Viability of probiotic bacteria in tropical mango juice and the resistance of the strains to gastrointestinal conditions simulated in vitro. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 40, n. 1, p. 149–162, 2019.

Grand View Research - **Dairy Alternatives Market Share & Growth Report, 2021–2028**. Available online: <https://www.grandviewresearch.com/industry-analysis/dairy-alternatives-market> Acesso em: 14 junho 2022.

Principais estados produtores. **A feira** - UFRGS, 2022. Disponível em < <http://www.ufrgs.br/alimentus/afeira/materias-primas/cereais/arroz/principaisestadosprodutores> > . Acesso em: 05 de junho, 2022.

GIBSON, G. R. *et al.* Expert consensus document: The International Scientific Association for Probiotics and Prebiotics (ISAPP) consensus statement on the definition and scope of prebiotics. **Nature Reviews Gastroenterology and Hepatology**, v. 14, p. 491-502, 2017. <https://doi.org/10.1038/nrgastro.2017.75>

GIORDANO, L. B. Cultivo da ervilha. Brasília: **EMBRAPA**, 1997. 19p. (Instruções Técnicas 1).

GONÇALVES, A. E. S. S. Avaliação da capacidade antioxidante de frutas e polpas de frutas nativas e determinação dos teores de flavonóides e vitamina C. 2008. 88 p. Trabalho de conclusão do mestrado (Ciência dos Alimentos) - **Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo**, São Paulo, 2008.

GORBACH, S. L. Probiotics in the third millennium. **Digestive and Liver Disease**, Milan, Italy, v. 34, n. 2, p. 2-7, 2002.

GUERREIRO, I. et al., **O Grande Livro dos Alimentos**. Rio de Mouro: Printer Portuguesa, 2008. 383 p.

HAMINIUK, C. W. I. *et al.* Chemical, antioxidant and antibacterial study of Brazilian fruits. **International Journal of Food Science & Technology**, v. 46, n. 7, p. 1529-1537, 2011.

HAY, A. J. *et al.* Chapter Two - In *Sickness and in Health: The Relationships Between Bacteria and Bile in the Human Gut*. In: SARIASLANI, S.; GADD, G. M. (Eds.). **Advances in Applied Microbiology**. Academic Press, v. 96, p. 43-64. 2016.

HERTZLER, S. R. et al. Plant proteins: Assessing their nutritional quality and effects on health and physical function. **Nutrients MDPI - Multidisciplinary Digital Publishing Institute** 2020.

HILL, C. *et al.* The International Scientific Association for Probiotics and Prebiotics consensus statement on the scope and appropriate use of the term probiotic. **Nature Reviews Gastroenterology and Hepatology**, v. 11, p. 506-514, 2014.

<https://doi.org/10.1038/nrgastro.2014.66>

HOLZAPFEL, W. H. *et al.* Overview of gut flora and probiotics. **International Journal of Food Microbiology**, v. 41, n. 2, p. 85-101, 1998



HOLZAPFEL, W. H. *et al.* Taxonomy and important features of probiotic microorganisms in food and nutrition. **The American Journal of Clinical Nutrition**, v. 73, n. 2, p. 365s–373s, 2001.

-

HUMPHREY, SP.; WILLIAMSON, RT. A review of saliva: Normal composition, flow, and function. **The Journal of Prosthetic Dentistry**, v.85, p.162-9, 2001.

HUSSAIN, S. A. *et al.* Ingredient formulation effects on physico-chemical, sensory, textural properties and probiotic count of Aloe vera probiotic dahi. **LWT - Food Science and Technology**, v. 65, p. 371–380, 2016.

IBOPE. **Pesquisa de opinião pública sobre vegetarianismo**. Ibope, Rio de Janeiro (2018) Disponível em: <  
[http://www.svb.org.br/images/Documentos/JOB\\_0416\\_VEGETARIANISMO.pdf](http://www.svb.org.br/images/Documentos/JOB_0416_VEGETARIANISMO.pdf)>. Acesso em: 15 de junho 2022.

JAEKEL, L. Z. *et al.* Avaliação físico-química e sensorial de bebidas com diferentes proporções de extratos de soja e de arroz. **Ciência e Tecnologia dos Alimentos, Campinas**, v. 30, n. 2, 2010.

JOHNSON, N. *et al.* The roles and potential of lentil prebiotic carbohydrates in human and plant health. **Plants People Planet**. Blackwell Publishing Ltd, 2020.

KAMBOJ, R.; NANDA, V. Proximate composition, nutritional profile and health benefits of legumes-A review. **Legume Research**. 2018, 41, 325–332. DOI: [10.18805/LR-3748](https://doi.org/10.18805/LR-3748)

KAN, L. *et al.* Comparative study on the chemical composition, anthocyanins, tocopherols and carotenoids of selected legumes. **Food Chemistry**. 2018, 260, 317–326. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2018.03.148>

KOPONEN, J. *et al.* Effect of acid stress on protein expression and phosphorylation in *Lactobacillus rhamnosus* GG. **Journal of Proteomics**, v. 75, n. 4, p. 1357–1374, 2012.

KORNET, R. *et al.* Substitution of whey protein by pea protein is facilitated by specific fractionation routes. **Food Hydrocolloids**, v. 117, p. 106691, 2021

KUMAR P. *et al.* Meat Analogues: Health Promising Sustainable Meat Substitutes. **Critical Reviews in Food Science Nutrition**. 2017, 57, 923–932. [CrossRef] [PubMed]

LACERDA MASSA, N. M. *et al.* Effects of digested jaboticaba (*Myrciaria jaboticaba* (Vell.) Berg) by-product on growth and metabolism of *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* indicate prebiotic properties. **LWT- Food Science and Technology**, v. 131, p. 109766, 2020.

LAM, A. C. Y. *et al.* Pea protein isolates: Structure, extraction, and functionality. **Food Reviews International**, 2018.

LAN, Y.; CHEN, B.; RAO, J. Pea protein isolate–high methoxyl pectin soluble complexes for improving pea protein functionality: Effect of pH, biopolymer ratio and concentrations. **Food Hydrocolloids**, v. 80, p. 245–253, 2018.

LANDERSJÖ, C. *et al.* Structural studies of the exopolysaccharide produced by *Lactobacillus rhamnosus* strain GG (ATCC 53103). **Biomacromolecules**, v. 3, n. 4, p. 880-884, 2002.

LOPES, M. *et al.* Legume Beverages from Chickpea and Lupin, as New Milk Alternatives. **Foods**, v. 9, n. 10, 2020.

MADUREIRA, A. R. *et al.* Protective effect of whey cheese matrix on probiotic strains exposed to simulated gastrointestinal conditions. **Food Research International**, v. 44, p. 465-470, 2011.

Markets and Markets. Meat Substitutes. **Market by Source (Soy Protein, Wheat Protein, Pea Protein), Type (Concentrates, Isolates, and Textured), Product (Tofu, Tempeh, Seitan, and Quorn), Form (Solid and Liquid), and Region—Global Forecast to 2026.** Available online: <https://www.marketsandmarkets.com/Market-Reports/meat-substitutes-market-979>. Acesso em: 7 de junho de 2022.

MARTÍN-PELÁEZ, S. *et al.* The Impact of probiotics, prebiotics, and synbiotics during pregnancy or lactation on the intestinal microbiota of children born by cesarean section: a systematic review. **Nutrients MDPI Multidisciplinary Digital Publishing Institute**, 2022.

MASIÁ, C.; JENSEN, P. E.; BULDO, P. Effect of lactobacillus rhamnosus on physicochemical properties of fermented plant-based raw materials. **Foods**, MDPI, 2020.

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, p. 187–197, 2018.

MCCLEMENTS, D. J. Development of next-generation nutritionally fortified plant-based milk substitutes: Structural design principles **Foods**, MDPI Multidisciplinary Digital Publishing Institute, 2020.

Mintel Reports. **Dairy and Non-Dairy Milk—US—September 2018**. Available online: <https://reports.mintel.com/display/860659/>. Acesso em: 7 de junho de 2022.

MOHANTY, D. *et al.* Prebiotics and synbiotics: Recent concepts in nutrition. **Food Bioscience**, v. 26, p. 152–160, 2018.

MUN, S.; SURH, J.; SHIN, M. Methods to improve rice protein dispersal at moderate pH. **Food Science and Biotechnology**, v. 29, n. 10, p. 1401–1406, 2020.

NAIA, I. I. P. Produção de alimentos funcionais inovadores a partir de tremçoço e ervilha com base no método de produção de tempeh de soja. 2015. 102 f. **Dissertação (Mestrado em Engenharia Alimentar)**, Universidade de Lisboa, Lisboa, 2015.

NATURALIS, S.; BRANCO, R. SCIENTIA NATURALIS Eugenia pyriformis “uvaia”: descrição, fitoquímica e usos na fitomedicina e nutrição. n. 1, p. 345, 2021.

NAWAZ, H. *et al.*, Effect of solvent polarity on extraction yield and antioxidant properties of phytochemicals from bean (*Phaseolus vulgaris*) seeds. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, 56. (2020). <https://doi.org/10.1590/s2175-97902019000417129>

NAZO, J. N. *et al.*, Studies on the interactions between bile salts and food emulsifiers under in vitro duodenal digestion conditions to evaluate their bile salt binding potential. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 174, n. 1, p. 493-500, 2019.

NOAD, R. L. *et al.* Beneficial effect of a polyphenol-rich diet on cardiovascular risk: A randomised control trial. **Heart**, v. 102, n. 17, p. 1371–1379, 2016.

NUALKAEKUL, S. *et al.*, Investigation of the factors influencing the survival of *Bifidobacterium longum* in model acidic solutions and fruit juices. **Food Chemistry**. 2011;129(3):1037-1044. doi:10.1016/j.foodchem.2011.05.071

PERRICONE, M. *et al.* Challenges for the Production of Probiotic Fruit Juices. **Beverages**, v. 1, n. 2, p. 95–103, 2015.

PIMENTEL, T. C. *et al.* Vegan probiotic products: A modern tendency or the newest challenge in functional foods. **Food Research International**, v. 140, p. 110033, 2021.

PINTO, S. S. *et al.* Potential use of whey concentrate and prebiotics as carrier agents to protect *Bifidobacterium*-BB-12 microencapsulated by spray drying. **Food Research International**, v. 67, p. 400–408, 2015.

**Plant-Based News. Sales of Vegan Food Skyrocket to \$3.3 Billion in One Year.** Available online: <https://plantbasednews.org/news/sales-of-vegan-food-skyrocket-3-3-billion/>?. Acesso em: 7 de junho de 2022.

PLOLL, U.; PETRITZ, H.; STERN, T. A social innovation perspective on dietary transitions: Diffusion of vegetarianism and veganism in Austria. **Environmental Innovation and Societal Transitions**, v. 36, p. 164–176, 2020.

POHJOLAINEN, P. *et al.*, Consumers' Perceived Barriers to Following a Plant-Based Diet. **British Food Journal**. 2015, 117, 1150–1167. [CrossRef ]

QAMAR, S. *et al.*, Nuts, cereals, seeds and legumes proteins derived emulsifiers as a source of plant protein beverages: A review. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition** 2020, 60, 2742–2762. <https://doi.org/10.1080/10408398.2019.1657062>

RANADHEERA, C. S. *et al.* Probiotic Delivery through Fermentation: Dairy vs. Non-Dairy Beverages. **Fermentation**, v. 3, n. 4, 2017

REVERÓN, I. *et al.* Molecular adaptation of *Lactobacillus plantarum* WCFS1 to gallic acid revealed by genome-scale transcriptomic signature and physiological analysis. **Microbial Cell Factories**, v. 14, n. 1, p. 160, 2015.

ROCHA, É. *et al.* Frutíferas Nativas da Mata Atlântica Paulista: vamos conhecê-las? / Native Fruits from São Paulo's Atlantic Forest: let's get to know them? **Brazilian Journal of Development**, v. 8, n. 1, p. 5278–5294, 19 jan. 2022.

RODRIGUES, L. M. *et al.* Uvaia (*Eugenia pyriformis* Cambess) residue as a source of antioxidants: An approach to ecofriendly extraction. **LWT-- Food Science and Technology**, v. 138, p. 110785, 2021.

RODET, J.C. 2006. **Guia dos Alimentos Vegetais**. 3 ed. Lisboa. Gradiva. 243 p.

SEGRS, M. E.; LEBEER, S. Towards a better understanding of *Lactobacillus rhamnosus* GG - host interactions. **Microbial Cell Factories**, v. 13, 2014.

SETTA, M.\_C. *et al.*, Potential of probiotics from fermented cereal-based beverages in improving health of poor people in Africa. **Journal of Food Science and Technology**, 57, 3935–3946 (2020). <https://doi.org/10.1007/s13197-020-04432-3>

SHEVKANI, K. *et al.*, Cowpea protein isolates: Functional properties and application in gluten-free rice muffins. **LWT - Food Science and Technology**, 63. (2015). <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2015.04.058>

SPLICHALOVA, A. *et al.*, Colonization of preterm gnotobiotic piglets with probiotic *Lactobacillus rhamnosus* GG and its interference with *Salmonella Typhimurium*. **Clinical and Experimental Immunology**, v. 195, n. 3, p. 381–394, 1 mar. 2019.

SILVA, A.R.A. *et al.*, Health Issues and Technological Aspects of Plant-Based Alternative Milk. **Food Research International** 2020, 131, 108972. [CrossRef] [PubMed]

TAMANG, J.P. *et al.*, Functional properties of microorganisms in fermented foods. **Frontiers in Microbiology**. 2016, 7, 578. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.00578>

TANGYU, M. *et al.* Fermentation of plant-based milk alternatives for improved flavour and nutritional value. **Applied Microbiology and Biotechnology** 2019.

The Good Food Institute. **Plant-Based Market Overview**. Available online: [https://www.gfi.org/marketresearch?utm\\_source=linkedin&utm\\_medium=social&utm\\_campaign=SPINS2019&utm\\_content=staff](https://www.gfi.org/marketresearch?utm_source=linkedin&utm_medium=social&utm_campaign=SPINS2019&utm_content=staff). Acesso em: 7 de junho de 2022.

VERNI, M. *et al.*, Design and characterization of a novel fermented beverage from lentil grains. **Foods**, v. 9, n. 7, 2020.

VERRUCK, S. *et al.* The buffalo Minas Frescal cheese as a protective matrix of *Bifidobacterium* BB-12 under in vitro simulated gastrointestinal conditions. **LWT-Food Science and Technology**, v. 63, n. 2, p. 1179-1183, 2015.

VERRUCK, S. *et al.* Effect of full-fat goat's milk and prebiotics use on *Bifidobacterium* BB-12 survival and on the physical properties of spray-dried powders under storage conditions. **Food Research International**, v. 119, p. 643–652, 2019.

VIALTA, A. *et al.* **Brasil food trends 2020**. São Paulo: FIESP; ITAL, 2010. Disponível em: <<http://www.alimentosprocessados.com.br/arquivos/Consumo-tendencias-einovacoes/Brasil-Food-Trends-2020.pdf>>. Acesso em : 7 de junho de 2022.

Vegan Society. **Statistics**. Disponível em: <https://www.vegansociety.com/news/media/statistics/>. Acesso em: 14 de junho de 2022.

ZHANG, X. *et al.* Rice peptide nanoparticle as a bifunctional food-grade Pickering stabilizer prepared by ultrasonication: Structural characteristics, antioxidant activity, and emulsifying properties. **Food Chemistry**, v. 343, p. 128545, 2021.

ZHAO, H., *et al.*, Comparison of wheat, soybean, rice, and pea protein properties for effective applications in food products. **Journal of Food Biochemistry**, 44(4). <https://doi.org/10.1111/jfbc.13157> (2020).