



UNIVERSIDADE
ESTADUAL DE LONDRINA

KARLA BIGETTI GUERGOLETTTO

**FRUTO DA PALMEIRA JUÇARA (*Euterpe edulis*) COMO
MATÉRIA-PRIMA PARA NOVOS PRODUTOS
PROBIÓTICOS, FERMENTAÇÃO NO CÓLON E ATIVIDADE
ANTIOXIDANTE**

Londrina
2017

KARLA BIGETTI GUERGOLETTO

**FRUTO DA PALMEIRA JUÇARA (*Euterpe edulis*) COMO
MATÉRIA-PRIMA PARA NOVOS PRODUTOS
PROBIÓTICOS, FERMENTAÇÃO NO CÓLON E ATIVIDADE
ANTIOXIDANTE**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência de Alimentos, nível doutorado, da Universidade Estadual de Londrina, como requisito parcial à obtenção do título de Doutor em Ciência de Alimentos

Orientadora: Profa. Dra. Sandra Garcia.

Londrina
2017

**Catálogo elaborado pela Divisão de Processos Técnicos da Biblioteca Central da
Universidade Estadual de Londrina**

Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)

G931f Guergoletto, Karla Bigetti.

Fruto da palmeira juçara (*Euterpe edulis*) como matéria-prima para novos produtos probióticos, fermentação no cólon e atividade antioxidante / Karla Bigetti Guergoletto. – Londrina, 2015.

166 f. : il.

Orientador: Sandra Garcia.

Tese (Doutorado em Ciência de Alimentos) – Universidade Estadual de Londrina, Centro de Ciências Agrárias, Programa de Pós-Graduação em Ciência de Alimentos, 2015.

Inclui bibliografia.

1. Alimentos fermentados – Teses. 2. Palmeira juçara – Teses. 3. Lactobacilo – Teses. 4. Probióticos – Teses. 5. Antioxidantes – Teses. 6. Palmito – Processamento – Teses. I. Garcia, Sandra. II. Universidade Estadual de Londrina. Centro de Ciências Agrárias. Programa de Pós-Graduação em Ciência de Alimentos. III. Título.

CDU

KARLA BIGETTI GUERGOLETTTO

FRUTO DA PALMEIRA JUÇARA (*Euterpe edulis*) COMO MATÉRIA-PRIMA PARA NOVOS PRODUTOS PROBIÓTICOS, FERMENTAÇÃO NO CÓLON E ATIVIDADE ANTIOXIDANTE

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência de Alimentos, nível doutorado, da Universidade Estadual de Londrina, como requisito parcial à obtenção do título de Doutor em Ciência de Alimentos

BANCA EXAMINADORA

Orientadora: Profa. Dra. Sandra Garcia
Universidade Estadual de Londrina - UEL

Profa. Dra Magali Soares dos Santos Pozza
Universidade Estadual de Maringá - UEM

Profa. Dra. Cinthia Hoch Batista de Souza
Universidade Norte do Paraná - UNOPAR

Profa. Dra. Marcela Maria Baracat
Universidade Estadual de Londrina - UEL

Profa. Dra. Wilma Spinosa
Universidade Estadual de Londrina - UEL

Londrina, 8 de outubro de 2015.

*Ao meu esposo Waleyd, pelo
amor, carinho, estímulo e por sempre
me apoiar
em minhas decisões.
À minha família,
meus pais Hélio e Cleuza
e meu irmão Gustavo, pelo amor,
confiança, e carinho incondicional
transmitidos por toda minha vida.*

Dedico

AGRADECIMENTOS

A Deus, por mais esta conquista, por se fazer presente em todos os momentos, sempre me guiando e colocando pessoas especiais; e por ter me dado forças para enfrentar todas as dificuldades que surgiram e pelos momentos de alegria que me concedeu ao longo dessa jornada.

À Prof. Dra. Sandra Garcia, pela valiosa orientação, amizade, pelos ensinamentos que proporcionaram meu crescimento pessoal e profissional e pela confiança que despertou meu profundo respeito e admiração.

Ao Professor Glenn R. Gibson, pela oportunidade de passar um período juntamente ao seu grupo de pesquisa na Universidade de Reading, Inglaterra, compartilhando conhecimentos que foram fundamentais para o meu crescimento profissional.

Aos docentes e funcionários do Departamento de Ciência e Tecnologia de Alimentos da Universidade Estadual de Londrina pelos ensinamentos e auxílio, em especial às professoras Elza Ioko Ida e Marta de Toledo Benassi, coordenadoras do curso da pós-graduação durante o meu período de doutoramento, que sempre estiveram à disposição para auxiliar em todas as dúvidas e etapas que foram surgindo.

À Fazenda Bimini, na pessoa de Daniel Steidle, por gentilmente coletar e fornecer os frutos da palmeira juçara, que foi fundamental na realização da pesquisa. Além disso, seus ensinamentos, carinho e envolvimento nas questões ambientais e na preservação da espécie da juçara, fizeram deste trabalho muito mais que uma “tese de doutorado a nível laboratorial”.

Ao Cnpq e à Capes, pelas bolsas de estudos concedidas para os estudos no Brasil e na Inglaterra, que foram imprescindível para a dedicação nesta pesquisa,

À Clerici-Sacco, na pessoa de Hans Knudsen, pelas culturas probióticas de *Lactobacillus reuteri* LR92 e *Lactobacillus plantarum* que foram de primordial importância para a realização da pesquisa.

À Nexira, na pessoa de Maria Fernanda Oliveira, pela goma acácia utilizada no estudo.

À Ingredion, na pessoa de Rafael Brito Nascimento, pela maltodextrina 10 DE utilizada no estudo.

À PB Liner Brasil, na pessoa de Dolores Mangini, pela gelatina utilizada no

trabalho.

Aos estagiários Carolina Saori Ishii Mauro, Maria Thereza Carlos Fernandes e Mateus Cicaglione pela amizade, colaboração e dedicação na execução dos experimentos.

À amiga Marli Busanello pela amizade sincera, carinho e por estar sempre presente.

Aos grandes amigos Marli, Marsilvio, Suzana, Naiara e Alessandra e que durante este período se tornaram “Hermanos” de coração e que fizeram toda diferença.

Aos amigos Fernando Sanches de Lima, André Luiz Buzzo Mori e Cintia Ladeira Handa pela amizade e auxílio na utilização dos cromatógrafos.

Aos companheiros de doutorado Ana Lucia Felício, Adriana Bosso, Paulo de Tarso, Jaqueline Camisa e Giselle Jacometti.

Aos demais colegas e estagiários do Programa de Pós-Graduação em Ciência de Alimentos, em especial: Dani Honorato, Maria Rita, Raíssa, Natália Niguma e Andréia Iak, pela amizade e pelos agradáveis momentos durante o doutoramento.

Aos amigos que conheci durante o doutorado sanduíche na Inglaterra, em especial, Adele Costabile, Gema Flores, Gemma Walton, Roberta Grimaldi, Xuedan Wang (Holy) e Alex Zheng, que fizeram desta etapa muito mais especial e alegre.

Às minhas grandes amigas Daniela Volci, Giselle Nobre, Gislaine Silveira Simões, pela amizade, conselhos e apoio em todos os momentos de insegurança.

Aos meus sogros: Dona Cida, Sr. Jamal; às minhas cunhadas e cunhado: Dede, Renatinha e Wini; à minha avó Lourdes, primos e tios que não consigo listar pois são muitos, que sempre torceram para que “tudo desse certo”.

A todos que direta ou indiretamente auxiliaram no desenvolvimento e conclusão deste trabalho.

Jamais considere seus estudos uma obrigação, mas como uma oportunidade invejável (...) para aprender a conhecer a influência libertadora da beleza do reino espiritual, para seu próprio prazer pessoal e para o proveito da comunidade à qual seu futuro trabalho pertencer” (Albert Einstein)

GUERGOLETTO, Karla Bigetti. **Fruto da palmeira juçara (*Euterpe edulis*) como matéria-prima para novos produtos probióticos, fermentação no cólon e atividade antioxidante**. 2015. 166 f. Tese (Doutorado em Ciência de Alimentos) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2015

RESUMO

Considerando a preocupação dos consumidores com a saúde e o potencial do fruto da palmeira juçara na alimentação humana como forma de preservação da espécie e fonte de compostos bioativos, este trabalho objetivou avaliar o extrato do fruto da juçara como potencial substrato para micro-organismos probióticos, em forma líquida ou desidratada, e avaliar seu efeito na microbiota intestinal humana. O efeito da polpa de juçara liofilizada na microbiota do cólon, foi avaliado *in vitro* e verificada a influência deste substrato nas bactérias benéficas e produção de ácidos graxos de cadeia curta. Para o desenvolvimento de novos produtos, a fermentação do extrato de juçara pelos probióticos *Lactobacillus reuteri* (LR) e *Lactobacillus plantarum* (LP), foi direcionada para a otimização de maior crescimento celular, seguido da avaliação da fermentação, consumo de açúcares, produção de ácido lático e atividade antioxidante. Em função dos resultados, o probiótico LR foi selecionado para o desenvolvimento do produto desidratado e foi submetido ao processo de desidratação por spray dryer aplicando maltodextrina, goma acácia e gelatina como carreadores de secagem e avaliando os três polímeros em relação a sobrevivência celular e aspectos tecnológicos do pó. Os pós produzidos foram empacotados em embalagens BOPP e garrafas de vidro e, o armazenamento em temperaturas de 4 °C e 25 °C foi acompanhado por 90 dias através de análises de viabilidade do probiótico, umidade, cor e solubilidade. A atividade antioxidante pelos métodos DPPH* e efeito contra estresse oxidativo, foram avaliados nos fermentados líquidos e desidratados para ambos micro-organismos. A formação de radicais livres durante a desidratação e armazenamento à 25 °C do pó fermentado com LR, foi avaliada pela técnica de espectroscopia de ressonância paramagnética eletrônica (RPE). Foi observado que a polpa de juçara favoreceu o crescimento de *Bifidobacterium*, e sua fermentação ocasionou aumento de propionato e acetato. Ambos probióticos foram capazes de crescer e fermentar os açúcares presentes no extrato líquido e puro, com produção de ácido lático, e aumento do potencial antioxidante. Após desidratação, a sobrevivência do LR nos pós ficou acima de 6,0 Log UFC/g e nos produtos produzidos com gelatina houve a maior sobrevivência após a secagem (8,63 Log UFC/g) e após 90 dias de estocagem à 4 °C (7,94 Log UFC/g). Os pós produzidos com gelatina apresentaram longos filamentos visíveis por microscopia eletrônica de varredura e os produzidos com maltodextrina e goma acácia apresentaram formas esféricas. Os maiores rendimentos de processo e solubilidades foram obtidos com o uso da maltodextrina e goma acácia. A temperatura de 25 °C foi prejudicial para a sobrevivência celular durante o armazenamento por 90 dias em ambas embalagens, e uma mudança na cor dos pós foi observada. As amostras fermentadas, líquidas e desidratadas, apresentaram uma elevada atividade antioxidante, com efeito redutor no estresse oxidativo. A secagem não ocasionou aumento na intensidade de radicais detectados por RPE, entretanto as condições de armazenamento estudadas diminuíram o poder antioxidante e aumentaram o número de radicais em todas as amostras desidratadas.

Palavras-chave: *Lactobacillus* spp. Spray-drying. Fenólicos. Protetores. RPE.

GUERGOLETTTO, Karla Bigetti. **Juçara palm fruit (*Euterpe edulis*) as a substrate for new probiotics products, colon fermentation and antioxidante activit.** 2015. 166 p. Thesis (Doctor Degree in Food Science) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2015.

ABSTRACT

Considering consumer concern about the health and the potential of juçara palm fruit in food, in order to protect the species and source of bioactive compounds, this study aimed to evaluate the extract of juçara fruit as a potential substrate for probiotic microorganisms, in liquid or dried form, and evaluate their effect on human intestinal microbiota. The effect of the lyophilized juçara pulp in *in vitro* fermentation by human colonic microbiota was assessed and verified the influence of this substrate in beneficial bacteria and short chain fatty acids production. For the development of new products, the fermentation by probiotics *Lactobacillus reuteri* (LR) and *Lactobacillus plantarum* (LP), was directed to enhanced the cell growth, followed by assessment of the fermentation, sugar consumption, lactic acid production and antioxidant activity. In function of the results, the probiotic LR was selected for the development of the dehydrated product and was subjected to the dehydration process by a spray dryer applying maltodextrin, gum acacia and gelatin as drying carriers and evaluating the three polymers in relation to cell survival and technological aspects of the powder. The powders produced were packed in BOPP pouches and glass bottles and storage at 4 °C and 25 °C temperatures for 90 days, and analysis of probiotic viability, moisture, color and solubility were conducted. The antioxidant activity by DPPH• methods and effects against oxidative stress, were evaluated in fermented liquid and dehydrated for both microorganisms. The formation of free radicals during dehydration and storage at 25 °C for the powder fermented with LR was evaluated by the technique of electron paramagnetic resonance spectroscopy (EPR). It was observed that juçara pulp favored the growth of *Bifidobacterium* and their fermentation caused an increase in propionate and acetate. Both probiotics were able to grow and ferment the sugars present in the pure extract, with lactic acid production and increase in antioxidant potential. After dehydration, the survival of the LR was over 6.0 log CFU/g and the products produced with the gelatin produced the highest survival after drying (8.63 Log CFU/g) and after 90 days of storage at 4 °C (7.94 Log CFU/g). The powders produced with gelatin had long filaments visible by scanning electron microscopy and the ones produced with maltodextrin and gum acacia showed spherical shapes. The highest process yield and solubility were obtained with the use of maltodextrin and gum acacia. The temperature of 25 °C was detrimental to cell survival during storage for 90 days in both packagings, and a change in color was observed. Fermented samples, liquid and dried, showed a high antioxidant activity, lowering the effects of oxidative stress. The drying process did not cause an increase in intensity of the radicals detected by EPR, however the studied storage conditions decreased the antioxidant and increased the number of radicals in all dehydrated samples.

Palavras-chave: *Lactobacillus* spp. Spray-drying. Phenolics. Probiotics. EPR.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

CAPÍTULO I

- Figura 1** – Representação esquemática da microbiota intestinal de um adulto. Principais generos estão apresentados em escala de UFC/g de fezes.....27
- Figura 2** – O palmito *Euterpe edulis* Mart38
- Figura 3** – Frutificação de juçara39
- Figura 4** – Estrutura química das principais classes de flavonóides distribuídos na natureza45
- Figura 5** – Velocidade relativa de reações em função da atividade de água.....48

CAPÍTULO II

- Figure 1** – Bacterial populations analysed by fluorescence *in situ* hybridization (FISH) in a batch culture fermentation containing juçara pulp, FOS and negative control at 0, 4, 8 and 24 h of fermentation. Results are reported as mean of the data (n = 3) Log CFU/mL \pm standard deviation (SD).....77

CAPÍTULO III

- Figure 1** – Response surface and profiles for the predicted values of *L. reuteri* (a) and *L. plantarum* (b) growth in juçara extract (*Euterpe edulis*). Viability results are expressed in Log CFU/mL.....103
- Figure 2** – Viability and pH of *L. reuteri* (a) and *L. plantarum* (b); sugar consumption by *L. reuteri* (c) and *L. plantarum* (d) and the lactic acid production of both microorganisms (e) during fermentation of juçara extract in optimised conditions106

CAPÍTULO IV

- Figure 1** – Scanning electron micrographs of spray-dried probiotic juçara extract produced using different carrier agents. (A) maltodextrin, (B) gum acacia, (C) gelatin. Magnification: 3000x; inset magnification:12000x..... 126
- Figure 2** – Moisture content (%) of spray-dried probiotic juçara extract with (A) maltodextrin, (B) gum acacia and (C) gelatin during storage at refrigerated (4 °C) and ambient temperature (25 °C), packaged in BOPP pouches and glass bottles for 90 days..... 128
- Figure 3** – Sorption isotherms of spray-dried probiotic juçara extract produced with maltodextrin (▲), gum acacia (●) and gelatin (□) 129

CAPÍTULO V

- Figura 1** – Efeito da presença de extratos de juçara fermentado por probióticos antes e após o processo de atomização com diferentes agentes carreadores de secagem (concentração das amostras no burst 20 µg/mL) na ativação de neutrófilos humanos por PMA..... 147
- Figura 2** – Espectros de RPE dos pós de juçara fermentado com *L. reuteri* utilizando diferentes agentes carreadores de secagem no tempo 0 e 90 dias de armazenamento à 25 °C 149

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO II

Table 1 –Composition and nutritional profile of the lyophilised juçara pulp used in the present study	75
Table 2 –Concentrations of major short-chain fatty acid during 0, 4, 8 and 24 h fermentation with juçara, FOS and negative control in stirred pH controlled batch culture system.Values are means with standard deviations (n = 3).....	78
Table 3 –Content of anthocyanins and phenolic compounds detected by HPLC in lyophilised juçara pulp before, during and after simulated in vitro human digestion. Values are means with standard deviation (n = 3).....	78
Table 4 –Phenolic compounds metabolism detected by HPLC during juçara fermentation by human colonic microbiota in pH controlled batch culture system for 24 h. Values are means with standard deviation (n = 3).....	79

CAPÍTULO III

Table 1 –Experimental design (22) with real and coded values (in parentheses) for the variables and results of <i>Lactobacillus reuteri</i> (LR) and <i>Lactobacillus plantarum</i> (LP) grown in filtered juçara extract after 48 hours of fermentation (Log CFU/mL)	100
Table 2 –Chemical (w.b) and mineral (d.b) composition of juçara extract used for fermentation.....	100
Table 3 –Estimated effects of initial pH and fermentation temperature (T °C) on <i>L. reuteri</i> (LR) and <i>L. plantarum</i> (LP) grown in Juçara extract.....	102
Table 4 –Values of total phenolic and antioxidant activity by DPPH• and ABTS ⁺ • methods during juçara fermentation by <i>L. plantarum</i> and <i>L. reuteri</i>	107

Tabela 5 –Viability of <i>L. plantarum</i> and <i>L. reuteri</i> (Log CFU/mL), total phenolic and antioxidant activity by DPPH• and ABTS ⁺ • of the fermented juçara extract for 28 days of storage at 4°C	109
--	-----

CAPÍTULO IV

Table 1 –Viable cell counts of <i>L. reuteri</i> (Log CFU per gram) in the spray-dried probiotic juçara extract, packaged in BOPP pouches or glass bottles, during storage at refrigerated (4 °C) and ambient temperature (25 °C) using different carriers.....	122
Table 2 –Estimated GAB* parameters for probiotic juçara extract powder produced with maltodextrin, gum acacia and gelatin	129
Table 3 –Solubility (%) of spray-dried probiotic juçara extract, packaged in BOPP pouches or glass bottles, during storage at refrigerated (4 °C) and ambient temperature (25 °C) for 90 days	131
Table 4 –Color parameters of spray-dried probiotic juçara extract produced with maltodextrin, gum acacia and gelatin as carriers	131
Table 5 –Instrumental color difference (ΔE^*) for spray-dried probiotic juçara extract, packaged in BOPP or glass bottles, during storage at refrigerated (4 °C) and ambient temperature (25 °C) for 90 days. Results are presented as color difference in relation to time 0 days	132

CAPÍTULO V

Tabela 1 –Fenólicos totais e capacidade antioxidante de juçara fermentada pelos probióticos <i>L. reuteri</i> e <i>L. plantarum</i> antes e após secagem por atomização com diferentes agentes carreadores.....	146
Tabela 2 –Atividade antioxidante e determinação de fenólicos totais de amostras de extrato de juçara fermentado com <i>L. reuteri</i> LR92 e desidratadas com diferentes agentes carreadores de secagem durante armazenamento à 25 °C por 90 dias	148
Tabela 3 –Parâmetros de EPR obtidos para as amostras de extrato de juçara liofilizado e fermentado com <i>L. reuteri</i> e desidratada por atomização utilizando diferentes agentes carreadores de secagem	150

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

a*	Componente vermelho-verde
ABNT	Associação Brasileira de Normas Técnicas
ABTS	2'-azinobis (3-ethylbenzothiazoline 6-sulfate acid)
ABTS ⁺ •	Radical do cátion ABTS
ANOVA	Análise de variância
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
b*	Componente amarelo-azul
BOPP	Polipropileno biorientado
CFU	Colony forming units
DPPH [•]	Radical 2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl
EPR	Electron paramagnetic resonance
ERO	Espécies reativas de oxigênio
FISH	Fluorescence <i>in situ</i> hybridization
HPLC	High performance liquid chromatography
L*	Luminosidade
p	Nível de Significância
ROS	Reatives oxygen species
RPE	Ressonância paramagnética eletrônica
SCFA	Short-chain fatty acids
SD	Standard deviation
UFC	Unidades formadoras de colônia

SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO GERAL	17
2.	OBJETIVOS	20
2.1	OBJETIVO GERAL	20
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	20
3.	REFERÊNCIAS	21
 CAPÍTULO I – REVISÃO BIBLIOGRÁFICA		24
1.1	ALIMENTOS FUNCIONAIS	24
1.2	INFLUÊNCIA DA ALIMENTAÇÃO NA MICROBIOTA INTESTINAL	26
1.3	PROBIÓTICOS	30
1.3.1	Benefícios Sobre o Hospedeiro Atribuídos aos Probióticos	33
1.3.2	Matrizes Não Lácteas Como Veículos de Probióticos	35
1.4	JUÇARA (<i>EUTERPE EDULIS</i>)	37
1.5	ATIVIDADE ANTIOXIDANTE	41
1.5.1	Radicais Livres e Oxidação	41
1.5.2	Antioxidantes e Compostos Fenólicos.....	42
1.5.3	Metodologias de Análises.....	44
1.6	DESIDRATAÇÃO DE ALIMENTOS.....	47
1.6.1	Spray-Drying.....	48
1.6.2	Desidratação de Probióticos.....	51
1.7	REFERÊNCIAS.....	55
 CAPÍTULO II – <i>IN VITRO</i> FERMENTATION OF JUÇARA PULP (<i>EUTERPE EDULIS</i>) BY HUMAN COLONIC MICROBIOTA¹		68
2.1	INTRODUCTION.....	69
2.2	MATERIALS AND METHODS	70
2.2.1	Juçara Pulp.....	70
2.2.2	Simulated In Vitro Human Digestion	71
2.2.3	Faecal Sample Preparation	72
2.2.4	Batch Culture Fermentation.....	72

2.2.5	Inoculation of Juçara Pulp in the Batch Culture Fermentation Systems.....	73
2.2.6	<i>In Vitro</i> Enumeration of Bacterial Population by FISH	73
2.2.7	High-Performance Liquid Chromatography Analysis	73
2.2.8	Total Phenolic Analysis.....	74
2.2.9	Statistical Analysis	75
2.3.	RESULTS	75
2.3.1	Changes in Bacterial Populations in In Vitro Batch Culture Fermentation	76
2.3.2	SCFA Production.....	76
2.3.3	Changes in Phenolic Compounds of Juçara Pulp During Digestion and Fermentation by Human Faecal Bacteria	77
2.4.	DISCUSSION	79
2.5.	CONCLUSION	84
2.6.	REFERENCES.....	84

CAPÍTULO III – Juçara (<i>Euterpe edulis</i>) extract as a substrate for <i>Lactobacillus reuteri</i> LR92 and <i>Lactobacillus plantarum</i> BG112 fermentation: optimization process and antioxidant activity².....		
3.1	INTRODUCTION.....	93
3.2	MATERIAL AND METHODS	94
3.2.1	Juçara Extract.....	94
3.2.2	Juçara Extract Chemical Composition	95
3.2.3	Microorganisms and Inoculum Preparation	95
3.2.4	Optimisation of <i>Lactobacillus reuteri</i> or <i>Lactobacillus plantarum</i> Growth in Filtered and Pasteurised Juçara Extract.....	95
3.2.5	Lactobacilli Growth and Fermentation Process	96
3.2.6	Storage Stability	97
3.2.7	Viable Cell Count Determination.....	97
3.2.8	pH, Sugars and Lactic Acid Determination	97
3.2.9	Total Phenolic Analysis.....	98
3.2.10	Antioxidant Activity	99
3.3	RESULTS AND DISCUSSION	99

3.3.1	Chemical and Mineral Composition of Juçara Extract	99
3.3.2	Optimisation of <i>Lactobacillus reuteri</i> and <i>Lactobacillus plantarum</i> Growth in Juçara Extract	100
3.3.3	Fermentation process	104
3.3.4	Total Phenolics and Antioxidant Activity During Fermentation.....	105
3.3.5	Storage Stability	108
3.4	CONCLUSION	109
3.5	REFERENCES.....	110

**CAPÍTULO IV – INFLUENCE OF CARRIER AGENTS ON THE SURVIVAL
OF *Lactobacillus reuteri* LR92 AND PHYSICOCHEMICAL
PROPERTIES OF FERMENTED JUÇARA EXTRACT
POWDER PRODUCED BY SPRAY DRYING³**

4.1	INTRODUCTION.....	115
4.2	MATERIAL AND METHODS	116
4.2.1	Probiotic Juçara Extract Preparation	116
4.2.2	Carriers Agents.....	117
4.2.3	Spray Drying Process	117
4.2.4	Viable Cell Count Determination.....	118
4.2.5	Physical Properties of Probiotic Powder	118
4.2.5.1	Powder yield	118
4.2.5.2	Scanning electron microscopy.....	118
4.2.5.3	Moisture content	119
4.2.5.4	Sorption isotherms.....	119
4.2.5.5	Solubility	120
4.2.5.6	Colour analysis	120
4.2.6	Storage Evaluation	120
4.2.7	Statistical Analysis.....	121
4.3	RESULTS AND DISCUSSION	121
4.3.1	Viable Cell Counts of <i>L. reuteri</i> in Probiotic Juçara Powder	121
4.3.2	Physical Properties of Spray Dried Probiotic Juçara Extract	124
4.3.2.1	Powder yield	125
4.3.2.2	Scanning electron microscopy.....	125
4.3.2.3	Moisture content and sorption isotherms.....	126

4.3.2.4	Solubility	130
4.3.2.5	Colour analysis	130
4.4	CONCLUSION	133
4.5	REFERENCES.....	133

**CAPÍTULO V – INFLUÊNCIA DA DESIDRATAÇÃO POR SPRAY DRYER
NA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DE EXTRATO DE
JUÇARA PROBIÓTICO E NA FORMAÇÃO DE RADICAIS
LIVRES DETECTADOS POR RPE⁴**..... 137

5.1	INTRODUÇÃO	138
5.2	MATERIAIS E MÉTODOS	140
5.2.1	Obtenção do Extrato de Juçara	140
5.2.2	Micro-organismos e Fermentação do Extrato de Juçara	140
5.2.3	Spray Drying.....	141
5.2.4	Avaliação do Efeito de Armazenamento sobre Extrato de Juçara Fermentado com <i>L. reuteri</i> e desidratado.....	142
5.2.5	Determinação do Teor de Fenólicos Totais.....	142
5.2.6	Medida da Atividade Antioxidante	142
5.2.7	Medida da Produção de Espécies Reativas de Oxigênio (ROS) por Neutrófilos 143	
5.2.8	Medida da Formação de Radicais Livres por RPE.....	144
5.2.9	Análise Estatística	145
5.3	RESULTADOS.....	145
5.3.1	Fenólicos Totais e Atividade Antioxidante de Juçara Fermentada por <i>L. reuteri</i> e <i>L. plantarum</i> Antes e Após Desidratação por Spray Drying	145
5.3.2	Efeito do Extrato de Juçara Fermentado e Desidratado Sobre ROS Produzidos por Neutrófilos	146
5.3.3	Efeito do Armazenamento por 90 Dias à 25 °C no Conteúdo de Compostos Fenólicos e Sequestro do Radical DPPH• de Juçara Fermentada por <i>L. reuteri</i> e Desidrata com Diferentes Agentes Carreadores.....	147

5.3.4	Formação de Radicais Livres Imediatamente Após Desidratação e Após 90 Dias de Armazenamento em Amostra de Juçara Fermentada com <i>L. reuteri</i>	148
5.4	DISCUSSÃO	150
5.5	CONCLUSÃO	155
5.6	REFERÊNCIAS.....	155
	CONCLUSÃO GERAL.....	161
	ANEXOS	163
	ANEXO 1: CERTIFICADO DE QUALIDADE DA MALTODEXTRINA.....	164
	ANEXO 2: CERTIFICADO DE QUALIDADE DA GOMA ACÁCIA	165
	ANEXO 3: CERTIFICADO DE QUALIDADE DA GELATINA	166

1. INTRODUÇÃO GERAL

O conceito de “alimentos funcionais” (Foods for Specified Health Use-FOSHU), foi iniciado em meados da década de 80 no Japão, com o intuito de desenvolver alimentos que possibilitassem a redução dos gastos com saúde pública e foram definidos como “alimentos similares em aparência aos convencionais, usados como parte de uma dieta normal, mas que apresentam efeitos benéficos fisiológicos e/ou, reduzem o risco de doenças crônicas, além de suas funções básicas nutricionais” (STRINGHETA et al., 2007).

Este conceito tem sido focado no efeito de agentes que possam combater danos causados pelo excesso de oxidação e também no efeito da dieta sobre bactérias intestinais. Isto se deve ao fato de que a alimentação é um importante fator de controle no que diz respeito às atividades da microbiota endógena, que pode conter espécies patogênicas e benéficas, e que estão diretamente relacionadas a respostas biológicas na saúde humana (GIBSON, 2008). Com isso uma grande variedade de produtos tem sido caracterizada como alimentos funcionais por apresentarem compostos bioativos que exercem o papel efetivamente benéfico, entre eles, as frutas, vegetais, cereais e probióticos (HOWLETT, 2008).

Neste contexto, os micro-organismos probióticos têm sido amplamente estudados e utilizados na alimentação, pois conferem efeitos benéficos ao hospedeiro através: da inibição de espécies patogênicas (NURMI; NUOTIO; SCHEITZ, 1992); atuação em desordens intestinais como constipação, diarreias provocadas por intolerância à lactose, doenças de Crohn, colites e síndrome do intestino irritável (HÖRMANNSPERGER; HALLER, 2010; SHERMAK et al., 1995); efeitos sobre o sistema imunomodulador com interações entre a microbiota e mucosa epitelial e o tecido linfóide (REMUS; KLEEREBEZEM; BRON, 2011); produção de metabólitos como ácidos graxos de cadeia curta (AGCC) que são importantes fontes de energia para as células epiteliais (RUSSELL et al., 2013); auxílio na prevenção de desordens celulares como o câncer de cólon e danos no DNA (GUARBER; MALAGELADA, 2003; WOLLOWSKI; RECHKEMMER; POOL-ZOBEL, 2001), entre outros.

A forma de consumo mais usual dos probióticos é em produtos lácteos, entretanto produtos fermentados de origem vegetal têm sido amplamente

considerados como um excelente vetor para incorporação destes micro-organismos (SOCCOL et al., 2010).

Novos dados científicos têm abordado os efeitos de promoção da saúde com estes produtos fermentados, pois nas frutas e vegetais podem ser encontrados altos níveis de substâncias benéficas, como os antioxidantes, vitaminas, fibras e sais minerais que aliados aos benefícios do probiótico, podem trazer contribuições adicionais à saúde do consumidor (PERES et al., 2012).

O oxigênio é essencial para a vida humana, entretanto também está envolvido em reações prejudiciais decorrentes da formação de espécies reativas de oxigênio (EROs), que estão diretamente relacionadas a diversas doenças e ao envelhecimento precoce. Para manter as EROs em equilíbrio, o corpo humano possui vários mecanismos de defesa, como as enzimas antioxidantes por exemplo, mas quando há uma excessiva exposição a estes agentes, além da capacidade protetora das defesas antioxidantes do corpo, ocorre o chamado estresse oxidativo, que favorece o aparecimento de doenças como Parkinson e Alzheimer. Para auxiliar as defesas do nosso organismo, uma variedade de antioxidantes pode ser encontrada na alimentação, como a vitamina E, vitamina C, carotenóides e polifenóis (HALLIWELL et al., 1995).

As frutas são amplamente conhecidas por sua importância alimentar e dados epidemiológicos comprovados mostram que o costume de consumir frutas e verduras, contribui com a redução do risco de ocorrência de doenças coronarianas e de câncer (FOOD INGREDIENTS BRASIL, 2010).

Entretanto, as frutas são altamente perecíveis e não estão disponíveis dependendo da época e região. Por isso uma forma de variar e facilitar o consumo destes alimentos é a utilização em sucos, polpas, purês e produtos desidratados.

A Juçara (*Euterpe edulis*), pertencente à família Arecaceae e ao gênero Euterpe, é uma palmeira encontrada principalmente distribuída em áreas da Mata Atlântica (BORGES et al., 2011; MARCOS; MATOS, 2003). A principal forma de consumo é através do palmito, entretanto esta prática tornou a planta ameaçada de extinção. Por isso, o uso da fruta na alimentação humana, apresenta-se como uma alternativa de grande potencial econômico, ambiental e nutricional (BORGES et al., 2011; COSTA et al., 2008).

Para o consumo, as bagas são maceradas com água e separadas de suas sementes, que podem ser replantadas, e a polpa produz uma bebida espessa, roxa, e rica em compostos fenólicos com ação antioxidante (BORGES et al., 2011).

O hábito de consumo de produtos desidratados tem aumentado no Brasil e no mundo devido à praticidade oferecida e pela falta de tempo dos consumidores em preparar e manter os produtos *in natura*. Considerando as tendências atuais de busca por alimentos saudáveis e de fácil preparo, a desidratação de polpa de frutas para utilização em bebidas instantâneas ou diretamente em alimentos, desponta como uma interessante alternativa (CANO-CHAUCA et al., 2005).

A secagem por atomização em spray dryer é uma das formas mais utilizadas para desidratação de alimentos. Este processo é considerado adequado para produtos líquidos e pastosos com compostos sensíveis, pois apresenta um rápido contato com o alimento, alta produção e menores custos em relação a liofilização (TONON et al., 2009).

Assim, considerando a possibilidade de inovação na área de produtos com propriedades funcionais, este trabalho objetivou avaliar o extrato de juçara como potencial substrato para micro-organismos probióticos, com ação antioxidante, em forma líquida e desidratada, além de avaliar o efeito da polpa na microbiota intestinal humana, incentivando o consumo deste fruto para possibilitar uma alternativa de uso e auxiliar na conservação da espécie e eventualmente provocar mudança de hábitos alimentares para uma forma de vida mais saudável.

2. OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

- ✓ Avaliar o efeito da fermentação do extrato de juçara no cólon em simulação *in vitro* e seu potencial uso como substrato para crescimento de microorganismos probióticos e diversificação de produtos em forma líquida ou desidratada com atividade antioxidante.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- ✓ Avaliar a fermentação do extrato de juçara por bactérias do cólon durante simulação intestinal *in vitro*;
- ✓ Otimizar e avaliar a fermentação do extrato da juçara (*Euterpe edulis* Mart.) pelos probióticos *Lactobacillus reuteri* e *Lactobacillus plantarum*;
- ✓ Desidratar o fermentado probiótico de juçara por spray-dryer;
- ✓ Avaliar os efeitos dos carreadores de secagem maltodextrina 10DE, goma acácia e gelatina na sobrevivência do probiótico, rendimento, isoterma de sorção, cor umidade e solubilidade dos pós produzidos;
- ✓ Acompanhar o tempo de prateleira dos produtos formulados;
- ✓ Determinar a atividade antioxidante e compostos fenólicos no extrato antes e após o processo de fermentação e secagem;
- ✓ Avaliar o efeito dos produtos formulados contra o estresse oxidativo induzido em neutrófilos.
- ✓ Verificar a formação de radicais livres nos extratos submetidos à secagem por spray dryer e armazenamento em temperatura de 25 °C.

3 REFERÊNCIAS

BORGES, G. S. da C.; VIEIRA, F. G. K.; COPETTI, C.; GONZAGA, L. V.; ZAMBIAZI, R. C.; FILHO, J. M.; FETT, R. Chemical characterization, bioactive compounds, and antioxidant capacity of Jussara (*Euterpe edulis*) fruit from the Atlantic Forest in southern Brazil. **Food Research International**, v. 44, p. 2128-2133, 2011.

CANO-CHAUCA, M.; STRINGHETA, P. C.; RAMOS, A. M.; CAL-VIDAL, J. Effect of the carriers on the microstructure of mango powder obtained by spray drying and its functional characterization. **Innovative Food Science and Emerging Technologies**, v. 6, p. 420-428, 2005.

COSTA, E. A. D.; GONÇALVES, C.; MOREIRA, S. R.; CORBELLINI, L. M. Produção de polpa e sementes de palmeira juçara: alternativa de renda para a Mata Atlântica. **Revista Tecnologia & Inovação Agropecuária**, p. 60-66, dez. 2008.

FOOD INGREDIENTS BRASIL. Alimentos vs. doenças. **Revista Food Ingredients Brasil**, v. 12, fev – mar, 2010. www.revista-fi.com. Acesso em: 01 de junho de 2012.

GUARNER, F.; MALAGELADA, J. R. Gut flora in health disease. **Lancet**, v. 361, p. 512-519, 2003.

GIBSON, G. R. Prebiotics as Gut Microflora Management Tools. **Journal of Clinical Gastroenterology**, v. 42, s. 2, p. S75-S79, 2008.

HALLIWELL, B.; AESCHBACH, R.; LÖLIGER, J.; ARUOMA, O. I. The Characterization of antioxidants. **Food and Chemical Toxicology**, v.33, n. 7, p. 601-617, 1995.

HOWLETT, John. **Alimentos funcionais: ciência, saúde e alegações**. ILSI Europe concise monograph series. 2008.

HÖRMANNSPERGER, G.; HALLER, D. Molecular crosstalk of probiotic bacteria with the intestinal immune system: Clinical relevance in the context of inflammatory bowel disease. **International Journal of Medical Microbiology**, v. 300, p. 63-73, 2010.

MARCOS, C. S.; MATOS, D. M. S. Estrutura de populações de palmitero (*Euterpe edulis* Mart.) em áreas com diferentes graus de impactação na floresta da Tijuca, RJ. **Floresta e ambiente**, v. 10, n. 1, p. 27-37, 2003.

NURMI, E.; NUOTIO, L.; SCHENEITZ, C. The competitive exclusion concept: Development and future. **International Journal of Food Microbiology**, v. 15, p. 237-240, 1992.

PERES, C. M.; PERES, C.; HERNANDEZ-MENDOZA, A.; MALCATA, F. X. Review on fermented plant materials as carriers and sources of potentially probiotic lactic

acid bacteria with an emphasis on table olives. **Trends in Food Science & Technology**, v. 26, n. 1, p. 31-42, 2012.

REMUS, D. M.; KLEEREBEZEM, M.; BRON, P. A. An intimate tête-à-tête – How probiotic lactobacilli communicate with the host. **European Journal of Pharmacology**, v. 668, p. s33-s42, 2011.

RUSSEL, W. R.; HOYLES, L.; FLINT, H. J.; DUMAS, M. E. Colonic bacterial metabolites and human health. **Current Opinion in Microbiology**, v. 16, p. 248-254, 2013.

SHERMAK, M. A; SAAVEDRA, J. M.; JACKSON, T. L.; HUANG, S. S.; BAYLESS, T. M.; PEMAN, J. A. Effect of yogurt on symptoms and kinetics of hydrogen production in lactose malabsorbing children. **American Journal of Clinical Nutrition**, v. 62, p. 1003-1006, 1995.

STRINGHETA, P. C.; VILELA, M. A. P.; OLIVEIRA, T. T.; NAGEM, T. J. **Alimentos “Funcionais”: Conceitos, contextualização e regulamentação**. Ed. Templo: Juiz de Fora, 246 p., 2007.

SOCCOL, C. R.; VANDENBERGHE, L. P. de S.; SPIER, M. R.; MEDEIROS, A. B. P.; YAMAGUISHI, C. T.; LINDNER, J. de D.; PANDEY, A.; SOCCOL, V. T. The potential of probiotics. **Food Technology Biotechnology**, v. 48, n.4, p. 413-434, 2010.

TONON, R. V.; BARONI, A. F.; BRABET, C.; GILBERT, O.; PALLET, D.; HUBINGER, M. D. Water sorption and glass transition temperature of spray dried açai (*Euterpe oleracea* Mart.) juice. **Journal of Food Engineering**, v. 94, p. 904-914, 2009.

WOLLOWSKI, I.; RECHKEMMER, G.; POOL-ZOBEL, B. L. Protective role of probiotics and prebiotics in colon cancer. **The American Journal of Clinical Nutrition**, v. 73, p. S451-S455, 2001.

A tese será apresentada em cinco capítulos distintos, descritos abaixo, seguidos de uma conclusão geral e Anexos:

I - Revisão Bibliográfica: Alimentos funcionais; Influência da alimentação na microbiota intestinal; Probióticos; Atividade Antioxidante; Juçara (*Euterpe edulis*); Desidratação de alimentos;

II – Artigo: *In vitro* fermentation of juçara pulp (*Euter edulis*) by human colonic microbiota;

III – Artigo: Juçara (*Euterpe edulis*) as a substrate for *Lactobacillus reuteri* LR92 and *Lactobacillus plantarum* BG112 fermentation: optimisation process and antioxidant activity;

IV – Artigo: Influence of carrier agents on the survival of *Lactobacillus reuteri* LR92 and physicochemical properties of fermented juçara extract powder produced by spray dryer;

V – Artigo: Influência da desidratação por spray dryer na atividade antioxidante de extrato de juçara probiótico e na formação de radicais livres detectados por RPE.

CAPÍTULO I REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

1.1 ALIMENTOS FUNCIONAIS

Os padrões de vida e de comportamento da sociedade atual, tornam-se cada vez mais complexos e com isso, algumas doenças chamadas de “doenças do mundo moderno”, como a síndrome do pânico, doenças cardiovasculares e câncer, têm surgido. Entretanto, os pesquisadores observaram que em alguns povos, apesar de comportamento semelhante, não apresentam as doenças na mesma intensidade e prevalência, como exemplo os orientais, que pelo elevado consumo de soja, apresentam menores incidências de câncer de mama (FOOD INGREDIENTS BRASIL, 2010). Através destas observações vários estudos envolvendo o consumo de certos alimentos e a prevenção de doenças têm sido conduzidos.

Alimentos com alegações de propriedades funcionais são aqueles que contêm substâncias que promovem efeitos benéficos à saúde, através da dieta normal, além das necessidades nutricionais básicas. E, embora pareça óbvio que, até certo ponto, todos os alimentos sejam funcionais, os alimentos com essas alegações devem promover a saúde física, mental e o bem-estar (HOWLETT, 2008).

O termo “alimentos funcionais” foi primeiramente introduzido no Japão em meados dos anos 80 com referência a alimentos processados contendo ingredientes que auxiliam funções específicas do corpo além de serem nutritivos. Em 1991, a lei japonesa definiu uma nova categoria de alimentos para uso nutricional especial, os quais tiveram permissão de divulgar alegações de efeitos específicos na saúde em seus rótulos caso tivessem comprovação. Estes alimentos foram designados como “Alimentos para uso específico de saúde” (Foods for Specified Health Use – FOSHU) e o objetivo à época era reduzir gastos com a saúde pública (STRINGHETTA et al., 2007).

Em meados do ano de 1990, em ação combinada, a Comissão Européia patrocinou uma atividade para explorar o conceito de alimentos funcionais, a FUFOSE (Ciência dos Alimentos Funcionais na Europa - *Functional Food Science in Europe*), e envolveu grande número de especialistas em nutrição e ciências afins, o que gerou um relatório de consenso que passou a ser amplamente utilizado como base para discussão e prosseguimento sobre este tópico (HOWLETT, 2008).

Embora até os dias atuais não exista uma definição mundialmente aceita para os alimentos funcionais, o termo “funcional”, implica que o alimento apresenta algum composto adicional identificado para o benefício à saúde, incluindo a redução do risco de doença para a pessoa que o esteja consumindo. E, apesar da ausência de uma única definição, diversas organizações definem essa categoria de alimento e, os critérios para sua aprovação, variam de acordo com a regulamentação local (STRINGHETA et al., 2007).

O órgão regulamentador brasileiro, a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), não define alimentos funcionais e sim as alegações de propriedades funcionais e de saúde de alimentos e ingredientes. De acordo com a legislação, estes alimentos ou ingredientes devem ser obrigatoriamente registrados na ANVISA após comprovação da eficácia e segurança de seu consumo. Até o momento foram aprovadas as alegações de propriedade funcional para ácidos graxos, carotenóides, fibras alimentares, fitoesteróis, poliós, probióticos e proteína de soja (BRASIL, 2008).

Devido a dificuldade em quantificar diretamente o efeito que determinado alimento tem sobre a saúde e o bem-estar e/ou diminuição do risco de doenças, a ciência dos alimentos funcionais trabalha a partir do conhecimento dos processos fundamentais vigentes na obtenção de uma saúde ideal ou na evolução de uma doença, identificando marcadores que possam ser utilizados para monitorar o efeito do consumo do alimento, ou seus componentes, nos processos fisiológicos. Os marcadores podem refletir alguma função biológica essencial (função-alvo) ou algum estágio intermediário. Como exemplo temos utilização da medição da composição da microbiota intestinal e/ou produção de ácidos graxos de cadeia curta durante a fermentação, para avaliar o efeito de carboidratos não-disponíveis, probióticos e prebióticos na saúde intestinal de humanos (HOWLETT, 2008).

O consumo destes alimentos e a associação à prevenção dos riscos de algumas doenças crônicas, ocorre porque podem atuar como moduladores dos processos metabólicos. Entre estes processos, há evidências científicas comprovadas do efeito de componentes de alimentos: no desenvolvimento e crescimento precoce humano; na regulação do balanço energético e peso corporal; na função cardiovascular; no desempenho físico, aptidão e estado mental; defesa contra o estresse oxidativo e; na função intestinal (microbiota do intestino) (HOWLETT, 2008; STRINGHETA et al., 2007).

1.2 INFLUÊNCIA DA ALIMENTAÇÃO NA MICROBIOTA INTESTINAL

Atualmente o conceito de alimentos funcionais tem sido direcionado significativamente para o estudo e controle da função intestinal, em particular no impacto sobre as bactérias intestinais. Isto se deve, possivelmente, ao aumento nos distúrbios gastrointestinais, mas também, ao fato de que a dieta é um importante fator de controle no que diz respeito às atividades da microbiota endógena, a qual pode conter espécies patogênicas e benéficas (ZOETENDAL; RAJULIC-STOJANOVIC; VOS, 2008). A predominância de bactérias patogênicas pode levar a problemas no intestino, de ordem aguda (gastroenterite) ou crônica (doença inflamatória do intestino). Por esta razão, os alimentos funcionais voltados para a microbiota do cólon serviriam para influenciar o metabolismo intestinal de uma forma positiva (GIBSON, 2008).

O cólon humano é um órgão com grande atividade metabólica, com um ecossistema microbiano extremamente complexo, atingindo contagens de 10^{14} bactérias por grama de conteúdo intestinal (GIBSON; ROBERFROID, 1995).

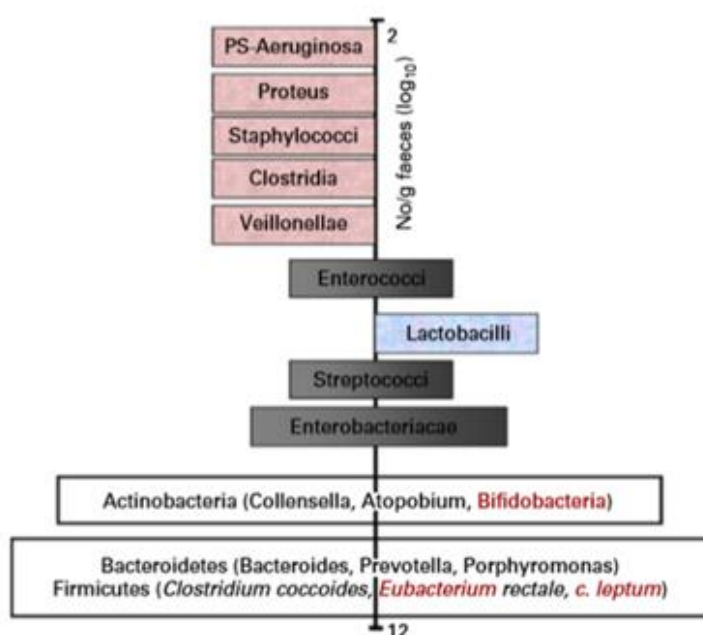
O trato gastrointestinal de um recém-nascido é estéril e, os micro-organismos que compõem sua microbiota são adquiridos no momento do parto, os quais são influenciados por fatores como a microbiota do trato genital da mãe, condições sanitárias, técnicas obstétricas, localização anatômica de espécies bacterianas e tipo de alimentação. De maneira geral, inicialmente há a predominância de espécies anaeróbias facultativas como *Escherichia coli*, que podem criar um ambiente altamente redutor que permite o crescimento de anaeróbios estritos e, depois desta fase, acredita-se que as diferenças na composição da microbiota dependerão em grande parte da alimentação (ISOLAURI; SALMINEN; OUWEHAND, 2004; MOUNTZOURIS; McCARTNEY; GIBSON, 2002).

Pelo menos quinze tipos de diferentes gêneros bacterianos e várias centenas de espécies individuais predominantemente residem no cólon. As atividades das bactérias colônicas são afetadas por parâmetros físico-químicos como a disponibilidade de substrato, potencial redox, pH, idade e saúde do hospedeiro, adesão bacteriana, cooperação e antagonismo bacteriano e, tempo de trânsito intestinal, influenciando no número e na diversidade das bactérias presentes nas diferentes regiões do trato digestivo. As espécies anaeróbias predominantes no intestino são os bacteroides, bifidobactérias, eubactérias, clostrídios, lactobacilos,

cocos anaeróbicos Gram-positivos, coliformes e bactérias sulfato-redutoras (GIBSON, 1998; LEY; PETERSON; GORDON, 2006).

Os efeitos maléficos produzidos pelas patogênicas incluem diarreia, infecções, danos ao fígado, carcinogênese e putrefação, enquanto os promotores da saúde incluem inibição de bactérias patogênicas, estimulação do sistema imune, diminuição de problemas de distensão por gases, melhora na digestão e absorção de nutrientes, produção de vitaminas, efeitos sistêmicos nos lipídios sanguíneos e são caracterizadas pela formação de ácidos graxos de cadeia curta (AGCC) que são benéficos ao hospedeiro (GUARNER; MALAGELADA, 2003; ROBERFROID et al., 2010). Na Figura 1 está demonstrado um balanço da microbiota intestinal, através de um esquema proposto por Gibson e Roberfroid (1995) e revisado por Roberfroid et al. (2010) de acordo com os mais recentes estudos sobre espécies com efeitos benéficos e maléficos da microbiota do cólon.

Figura 1. Representação esquemática da microbiota intestinal de um adulto. Principais gêneros estão apresentados em escala de UFC/g de fezes.



FONTE: ROBERFROID et al. (2010)

PS: *Pseudomonas*

Gêneros do lado esquerdo são potencialmente prejudiciais enquanto os do lado direito são potencialmente benéficos a saúde. Aqueles situados em ambos lados, direito e esquerdo contém espécies que são potencialmente prejudiciais e espécies potencialmente benéficas ou contém espécies/gêneros que ainda precisam ser classificados. Incluem muitas espécies que foram recentemente identificadas na microbiota intestinal e cujas atividades ainda são amplamente desconhecidas.

Através do processo fermentativo, as bactérias colônicas são capazes de produzir uma variedade de compostos que podem apresentar tanto efeitos positivos quanto negativos na fisiologia intestinal bem como outras influências sistêmicas (GIBSON; ROBERFROID, 1995), sendo os ácidos graxos de cadeia curta (AGCC), os principais produtos deste metabolismo no intestino. São formados principalmente a partir das fibras alimentares, oligossacarídeos, proteínas, peptídeos e precursores glicoproteicos.

As fibras alimentares consistem em uma variedade de polissacarídeos não amiláceos, que incluem a celulose, hemicelulose, inulina; pectina, β -glucanas, gomas e lignina. As frutas, vegetais, cereais e legumes são os alimentos mais ricos destes componentes, entretanto podem ser extraídos também de fungos (GIBSON, 2004/a; SUGAWARA et al., 2004; FIGUEROLA et al., 2005). Fibras alimentares dispõem de diferentes graus de solubilidade em água, e desta forma, as fibras classificam-se em solúveis e insolúveis. As fibras solúveis caracterizam-se por formar géis e pela sua capacidade de captar água. Ligam-se aos sais biliares no intestino, diminuindo sua reabsorção, o que resulta em menos colesterol disponível no fígado para a síntese de lipoproteínas (GRAY, 2006).

Além de serem fermentadas pelas bactérias colônicas dando origem a ácidos graxos de cadeia curta, gás, água e energia, as fibras solúveis contribuem também para o aumento do volume das fezes (PIMENTEL; FRANCKI; GOLLÜCKE, 2005), podem prolongar o esvaziamento gástrico e reduzir a absorção de glicose (ROBERFROID, 1993). Alguns exemplos de fibras solúveis são a pectina, hemicelulose, goma guar e a inulina (GIBSON, 2004/a).

Os principais ácidos graxos resultantes das fermentações de carboidratos e aminoácidos, são o acetato, o propionato e o butirato. Em menores quantidades são também produzidos formato, valerato, caproato e os produtos do catabolismo de aminoácidos de cadeia ramificada, o iso-butirato, metil-butirato e iso-valerato. Produtos intermediários da fermentação no cólon incluem o lactato, etanol, succinato e piruvato, os quais são metabolizados em diferentes quantidades de AGCC, o que permite ganho de energia adicional para o hospedeiro a partir da fermentação e usualmente não se acumulam substancialmente no cólon (MACFARLANE; MACFARLANE, 2003).

Os AGCC produzidos no cólon pela microbiota, apresentam uma importante função, geralmente acidificam o pH do lúmen o que suprime a multiplicação de

patógenos, além de influenciar na motilidade intestinal. Eles são rapidamente absorvidos pela mucosa e contribuem para o fornecimento de energia ao hospedeiro (CHAMBERS et al., 2014; RUSSEL et al., 2013). O acetato é principalmente metabolizado no músculo humano, nos rins, coração e cérebro (ROBERFROID et al., 2010). Além disso, juntamente com propionato apresentam uma função direta na regulação do apetite. O butirato por sua vez, é altamente metabolizado nas células epiteliais como principal fonte de energia, além de ser um regulador do crescimento celular e poder reduzir o risco do câncer de cólon através do estímulo da apoptose (TOLHURST et al., 2012),

A composição da microbiota de um indivíduo é considerada relativamente estável por longos períodos de tempo, entretanto a fermentação de certos substratos influenciam esta estabilidade. Geralmente, bactérias que apresentam um exclusivo metabolismo sacarolítico, podem ser consideradas como potencialmente benéficas e tal perfil metabólico é típico de lactobacilos e bifidobactérias (GIBSON et al., 2010; JANKOVIK et al., 2010). Por outro lado, espécies proteolíticas podem ocasionar acúmulo de produtos como amônia e aminas que são envolvidos em diversos efeitos maléficos no intestino (GIBSON, 1998).

Por isso, há um grande interesse na manipulação da composição da microbiota intestinal através do aumento do número e atividades de grupos bacterianos que apresentam propriedades promotoras da saúde, como bifidobactérias e lactobacilos. Este efeito é possível devido ao uso de adjuntos na alimentação que são capazes de atingir de forma intacta o cólon e serem especificamente fermentados (GIBSON 2004/a; WIELE et al., 2004).

Tais ingredientes foram primeiramente definidos por GIBSON e ROBERFROID (1995) como “ingrediente alimentar não digerível que afeta benéficamente o hospedeiro por estimular seletivamente o crescimento e/ou a atividade de uma ou mais bactérias no cólon, e assim melhorar a saúde do hospedeiro” e, a partir daí um grande número de estudos com intervenção em humanos tem sido conduzidos e demonstraram que o consumo de certos alimentos pode resultar em diferenças estatisticamente significativas na composição da microbiota (ROBERFROID et al., 2010).

Atualmente o efeito prebiótico é um fato científico bem estabelecido e estudos em modelos experimentais (MACCAFERRI et al., 2012) e com humanos (VULEVIC et al., 2007), demonstram os efeitos benéficos de alguns produtos alimentares com

propriedades prebióticas, na homeostase energética, regulação da saciedade e ganho de peso corporal (GIBSON et. al., 2010; HUEBNER; WEHLING; HUTKINGS, 2007; MUSSATTO; MANCILHA, 2007).

Além do efeito já efetivamente comprovado de carboidratos, diversos estudos têm demonstrado que o uso de polifenóis e antocianinas são também dependentes da absorção e metabolismo no trato gastrointestinal, o que parece contribuir para o aumento de bactérias benéficas e na modulação intestinal (HIDALGO et al., 2012). São estimados que apenas 5-10 % do total da ingestão de polifenóis são absorvidos no intestino delgado, remanescendo cerca de 90-95 % para serem utilizados pela microbiota durante a fermentação, o que resulta na quebra das estruturas originais dos polifenóis em metabólitos de baixo peso molecular, que são absorvidos e podem efetivamente ser os responsáveis pelo efeito de saúde que o consumo de alimentos ricos nestes ingredientes trazem (CARDONA et al., 2013).

1.3 PROBIÓTICOS

Conforme já retratado anteriormente, o trato gastrointestinal humano é composto por uma microbiota diversificada e complexa, que difere em sua composição de acordo com a idade, estado de saúde e modo de vida do hospedeiro, variando ao longo dos órgãos, no lúmen e na mucosa e que exerce grande influência na saúde do indivíduo (MOUNTZOURIS; McCARTNEY; GIBSON, 2002).

Além do uso de alimentos que contém ingredientes que estimulam a modulação da composição da microbiota intestinal, uma abordagem muito empregada e estudada é a utilização e consumo de micro-organismos vivos na alimentação, os chamados probióticos.

A palavra probiótico é derivada do grego e significa “em prol da vida” e a ela foram atribuídos diferentes significados através dos anos. A primeira observação do papel positivo que algumas bactérias apresentavam foi atribuída a Elie Metchnikoff (1905), que salientou a importância dos lactobacilos na microbiota intestinal, atribuindo-lhes a propriedade de manutenção da saúde e longevidade do hospedeiro (FAO, 2002). Em 1906, Henry Tissier (1906), observou que crianças com diarreia tinham em suas fezes um baixo número de bactérias caracterizadas por uma morfologia peculiar em forma de “Y”, que ao contrário, eram observadas abundantemente em crianças saudáveis. Por isso, Tissier sugeriu que estas

bactérias poderiam ser administradas em pacientes com diarreia para ajudar a reestabelecer uma microbiota intestinal saudável (FAO, 2002).

O termo “probiótico” foi proposto primeiramente por Lilly e Stillwell (1965), para se referir a uma “substância secretada por um micro-organismo que estimula o crescimento de outro” (SOCCOL, 2010). Em 1974, Parker utilizou pela primeira vez o termo com o conceito de que a utilização de organismos e substâncias que contribuem para o balanço da microbiota intestinal; mas foi Fuller em 1989, que redefiniu e popularizou o termo ‘probiótico’ como sendo “um suplemento de micro-organismos vivos que afeta benéficamente o animal hospedeiro pela melhora no balanço microbiano intestinal” (FULLER, 1992). A partir daí o termo probiótico vem sendo amplamente utilizado com apenas algumas sutis alterações.

Segundo a FAO (2002), probióticos são definidos como “micro-organismos vivos que quando administrados em quantidades indicadas conferem benefício à saúde do hospedeiro”. No Brasil, a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) define probióticos como micro-organismos vivos capazes de melhorar o equilíbrio microbiano intestinal produzindo efeitos benéficos à saúde do indivíduo (BRASIL, 2002).

De acordo com a legislação brasileira, a quantidade mínima viável para os probióticos deve estar situada na faixa de 10^8 a 10^9 UFC na recomendação diária do produto pronto para o consumo, entretanto valores menores podem ser aceitos com a comprovação da eficácia pela empresa que comercializa (BRASIL, 2008).

Em julho de 2008, a Anvisa alterou a lista de micro-organismos probióticos utilizados comercialmente no Brasil, e atualmente, as bactérias *Lactobacillus acidophilus*, *L. casei shirota*, *L. casei* variedade *rhamnosus*, *L. casei* variedade *defensis*, *L. paracasei*, *Lactococcus lactis*, *Bifidobacterium bifidum*, *B. animalis* (incluindo a subespécie *lactis*), *B. longum* e *Enterococcus faecium* são assim consideradas (BRASIL, 2008). Já nos demais países, os órgãos reguladores como FAO e WHO caracterizam como probióticos um número mais amplo de micro-organismos (SOCCOL et al., 2010).

Os principais micro-organismos probióticos utilizados comercialmente, são originários do trato gastrointestinal de humanos, sendo os gêneros *Lactobacillus* e *Bifidobacterium*, os mais estudados. Entretanto, pesquisas também têm sido conduzidas com os gêneros *Pediococcus*, *Leuconostoc*, *Propionibacterium* e *Enterococcus faecium* (SHAH, 2007).

Para que os probióticos exerçam suas propriedades benéficas é necessário primeiramente que o micro-organismo seja capaz de sobreviver ao baixo pH do estômago, às enzimas digestivas e à bile presentes no intestino delgado durante a passagem pelo trato gastrointestinal (JENSEN et al., 2012).

É desejável que o micro-organismo não apresente patogenicidade ou toxicidade, ter origem na microbiota humana e deve-se verificar as propriedades intrínsecas, como resistência a antibióticos, segurança para o consumo humano, sobrevivência em ambiente com baixo pH e capacidade de adesão à mucosa intestinal. Além disso, a cultura deve estabilizar a microbiota intestinal mantendo o ambiente desfavorável a patógenos e ter a capacidade de colonizar o trato gastrointestinal humano após sobreviver em produtos alimentares durante o processamento e armazenamento (MYERS, 2007; VASILJEVIC; SHAH, 2008)

A introdução de probióticos em alimentos é freqüente, embora sua utilização apresente desafios quando em grande escala com relação à manutenção da estabilidade e viabilidade durante armazenamento e uso (GIBSON, 2004/b). Entre os veículos alimentares para probióticos estão os iogurtes, bebidas lácteas fermentadas, suplementos liofilizados (cápsulas, pílulas, suspensões líquidas e *sprays*), queijos e sucos de frutas (VASILJEVIC; SHAH, 2008).

O *Lactobacillus reuteri* é uma das bactérias lácticas que residem no trato gastrointestinal (TGI) de humanos e animais, frequentemente é utilizado em alimentos probióticos (JONES et al., 2012). Esta linhagem pode tolerar condições ambientais desfavoráveis no trato digestivo, colonizar o TGI pela aderência às células epiteliais para formar um mecanismo de defesa, prevenindo contra infecções de patógenos através da exclusão competitiva e reduzir efeitos de distúrbios intestinais severos (CHEN et al., 2012; COCCORULLO et al., 2010; JONES et al., 2012).

O *Lactobacillus plantarum* é frequentemente associado à fermentação vegetal, embora possa ser encontrado em vários nichos ambientais, incluindo fermentados lácteos e cárneos (VESCOVO et al., 1993). Estudos têm atribuído ao *L. plantarum* habilidades de colonizar o intestino de humanos, modular o sistema imune, reduzir o risco de doenças cardiovasculares, atenuar problemas intestinais entre outros (COSTA et al., 2014; WANG et al., 2009).

1.3.1 Benefícios Sobre o Hospedeiro Atribuídos aos Probióticos

Os micro-organismos probióticos podem fornecer diversos benefícios à saúde humana e animal, principalmente através da manutenção e composição de uma microbiota intestinal equilibrada. De acordo com a FAO/WHO (2002), existem evidências de efeitos sobre: a prevenção de diarreia ocasionada por bactérias patogênicas e vírus (DINLEYICI et al., 2013); atuação sobre infecções ocasionadas por *Helicobacter pylori* (MYLLYLUOMA et al., 2005); atuação sobre doenças inflamatórias e síndromes intestinais (BASSAGANYA-RIERA et al., 2012); prevenção do câncer (SAKATANI et al., 2013); alívio na constipação intestinal; modulação do sistema imune (KEMGANG et al., 2014) e prevenção de alergias; atuação sobre as doenças cardiovasculares (DIRIENZO, 2014) e; prevenção de desordens urogenitais. Entretanto, para que alegações de tais propriedades possam ser feitas, a comprovação dos efeitos *in vitro* e *in vivo* é uma exigência de órgãos reguladores (BRASIL, 2008; FAO/WHO, 2002).

Para realizar os benefícios reportados, as bactérias probióticas precisam sobreviver à passagem ao TGI, atingir o epitélio e chegar aos receptores que permitirão a adesão nas superfícies da mucosa intestinal, impedindo a colonização por espécies patogênicas (OHASHI; USHIDA, 2009). O antagonismo contra micro-organismos patogênicos é uma das características mais promissoras relacionadas aos probióticos e o mecanismo de ação ocorre principalmente através da “exclusão competitiva” por sítios de adesão e nutrientes, além da produção de antimicrobianos (GUARNER; MALAGELADA, 2003). Em relação aos efeitos dos probióticos sobre *H. pylori*, acredita-se que estejam relacionados principalmente às substâncias antimicrobianas como os ácidos orgânicos, que inibem o crescimento e adesão, além do efeito sobre o sistema imunomodulador do hospedeiro que reforça as defesas contra este micro-organismo patogênico (VASILJEVIC; SHAH, 2008).

Vários estudos têm avaliado o uso de probióticos na prevenção de desordens intestinais causadas por alergias alimentares, antibioticoterapia e gastroenterites (ISOLAURI; SALMINEN; OUWEHAND, 2004). As infecções intestinais como colites, síndrome do intestino irritável e doença de Crohn podem ser minimizadas com a ingestão de probióticos e este efeito é atribuído ao aumento no número de anticorpos, que promovem melhorias no sistema imunomodulador do hospedeiro (WALKER, 2008). A intolerância à lactose pode ser minimizada com o uso de

probiótico e isto é devido principalmente à presença da enzima β -galactosidase nas células bacterianas que auxiliam na quebra da lactose antes que atinjam o cólon do consumidor (SHAH, 2007).

Uma das atividades metabólicas dos probióticos está associada à influência na biodisponibilidade e digestibilidade de nutrientes, e seu uso pode aumentar significativamente o valor nutritivo e terapêutico dos alimentos através do aumento nos níveis de vitaminas do complexo B e aminoácidos decorrentes da hidrólise enzimática de proteínas e gorduras (KOOP-HOOLIHAN, 2001), além de contribuir com a absorção de cálcio, ferro e magnésio (COUDRAY et al., 2005; ROLFE, 2000).

O efeito dos probióticos sobre a resposta imune tem sido bastante estudado. Com a descoberta dos receptores de reconhecimento padrão toll-like (TLRs), que são proteínas receptoras presentes na superfície de células cujo papel é reconhecer moléculas que, quando ultrapassam as barreiras físicas da mucosa do trato intestinal ou pele, ativam as respostas imunes celulares, o entendimento da atividade imunomodulatória dos probióticos têm recebido avanços (AKIRA et al., 2001; CORTHÉSY et al., 2007). Entre estas células podem ser citadas os macrófagos, monócitos, células dendríticas e células epiteliais. Desta forma acredita-se que estes efeitos possam ser mediados por uma ativação dos macrófagos; por um aumento nos níveis de citocinas; por um aumento da atividade das células destruidoras naturais e/ou dos níveis de imunoglobulinas (GUARNER; MALAGELADA, 2003; WALKER et al., 2008).

O papel dos probióticos sobre algumas doenças cardiovasculares como a hipertensão e hipercolesterolemia também tem sido reportado por diversos estudos e os mecanismos de ação estão principalmente relacionados aos efeitos da microbiota intestinal no metabolismo lipídico, através da assimilação do colesterol durante o crescimento microbiano e/ou a ligação do colesterol na superfície da parede celular das bactérias (LIONG; SHAH, 2005). Além disso, alguns microorganismos probióticos podem desconjugar os ácidos biliares através de enzimas hidrolases, que serão reabsorvidos com menor eficiência, resultando no aumento da sua excreção nas fezes (VASILJEVIC; SHAH, 2008).

Em relação aos efeitos dos probióticos sobre o câncer de cólon, vários mecanismos de ação são sugeridos, embora ainda não estejam completamente elucidados. Entre eles podemos citar o efeito através do estímulo da resposta imune do hospedeiro, a ligação e a degradação de compostos carcinogênicos, produção de

compostos antitumorígenos no cólon, alteração da atividade metabólica da microbiota intestinal, alteração das condições físico-químicas do cólon, entre outros (RAFTER, 2003). Entretanto, embora pesquisas voltadas à prevenção do câncer sejam promissoras, os resultados ainda são considerados preliminares para recomendações de uso dos probióticos neste sentido (KOPP-HOOLIHAN, 2001).

1.3.2 Matrizes Não Lácteas Como Veículos de Probióticos

Atualmente, há um crescente aumento do interesse dos consumidores por alimentos probióticos como uma alternativa para melhorar a saúde. A maioria dos produtos probióticos encontrados no mercado são à base de leite, incluindo bebida láctea, iogurtes, queijos e gelados e, apesar de ser um substrato usual para a manutenção destes micro-organismos, os derivados lácteos apresentam alguns inconvenientes como o transporte, teor de colesterol e serem restritos a pessoas não intolerantes e não alérgicas aos componentes (YEO et al., 2011).

Diante disto, o desenvolvimento de novas alternativas para o consumo tem ganhado cada vez mais atenção da comunidade científica e industrial e, com isso, novos produtos como aqueles a base de soja, de cereais, frutas, outros vegetais e produtos cárneos são desenvolvidos como potenciais carreadores. Adicionalmente, estas matrizes não lácteas contêm quantidades razoáveis de carboidratos, fibras, proteínas e vitaminas que podem favorecer a manutenção dos probióticos nestas matrizes (YEO et al., 2011).

A viabilidade e estabilidade dos probióticos tem sido um grande desafio mercadológico e tecnológico para os produtores de alimentos, já que os alimentos probióticos devem conter linhagens específicas e manter um nível adequado de células viáveis durante a vida de prateleira do produto. Antes de chegarem aos consumidores, precisam primeiramente ser produzidos sob condições industriais e manter a funcionalidade durante estocagem. Em seguida precisam ser capazes de sobreviver durante o processamento do alimento ao qual é adicionado e, por fim, quando ingeridos, precisam sobreviver sob as condições de estresse do trato gastrointestinal e realizar os efeitos benéficos no hospedeiro. Além disso, devem ser incorporados aos alimentos sem produzir sabores e texturas desagradáveis (MATTILA-SANDHOLM et al., 2002).

A aplicação de probióticos em matrizes não lácteas pode se tornar um grande desafio, já que diversos fatores podem influenciar a sobrevivência destes organismos e sua atividade quando passam pelo trato gastrointestinal dos consumidores. Entre eles podem ser considerados: o estado fisiológico do organismo probiótico adicionado, em função da fase logarítmica ou estacionária; a concentração adequada de células viáveis no produto no momento do consumo; condições físicas durante a estocagem do produto; a composição química do produto ao qual o probiótico é adicionado tais como pH, atividade de água e, conteúdos de carbono, nitrogênio, minerais, sódio e oxigênio (RIVERA-ESPINOZA; GALLARDO-NAVARRO, 2010).

Os cereais são considerados uma das mais importantes fontes de proteínas, carboidratos, vitaminas, minerais e fibras. Além disso, podem ser utilizados como fonte de carboidratos não digeríveis que além de promover diversos benefícios fisiológicos, podem também seletivamente promover o crescimento de *Lactobacillus* spp. e *Bifidobacterium* spp. presentes no cólon (SHAH, 2001). Por isso, estudos têm sido realizados a fim de otimizar a combinação entre os cereais e os probióticos. Charalampopoulos, Pandiella e Webb (2003), verificaram o crescimento de probióticos em diferentes matrizes de cereais e reportaram que o crescimento destes micro-organismos depende do cereal e da linhagem estudada. A aveia, uma das maiores fontes de beta-glucana, é comumente utilizada para conduzir estudos com probióticos. Guergoletto et al. (2010) conseguiram alta sobrevivência de *L. casei* aderido ao farelo de aveia quando submetido ao processo de secagem à vácuo.

As frutas e vegetais constituem-se em um veículo alternativo para a administração dos probióticos. Entretanto, a inclusão destes micro-organismos em sucos de frutas e a manutenção da viabilidade é desafiante já que o pH é frequentemente baixo (< 4,0), e algumas frutas podem conter algumas substâncias antimicrobianas. Para minimizar estes fatores, o suco de fruta pode ser formulado com um maior valor de pH e menores teores de substâncias antimicrobianas (OUWEHAND; SVENDSEN; LEYER, 2011).

Apesar disso, o processo de fermentação de vegetais por bactérias probióticas tem sido amplamente estudado, pois promovem a adição dos benefícios das frutas e dos probióticos. Adicionalmente, a fermentação melhora as características do produto bem como elimina certos constituintes indesejáveis, deixa os nutrientes mais acessíveis e melhora as propriedades nutricionais dos produtos

(PERES et al., 2012). Sheehan, Ross e Fitzgerald (2007), avaliaram a sobrevivência de diversas linhagens probióticas em sucos de laranja, abacaxi e *cranberry* e observaram que além do pH do suco, a linhagem probiótica e o tipo da fruta, influenciam na sobrevivência celular no produto final.

Pereira, Maciel e Rodrigues (2011) obtiveram uma sobrevivência de 8 Log UFC/mL de *L. casei* em suco de caju fermentado quando o pH inicial era 6,4 e temperatura de fermentação em 30 °C. Yoon, Woodams e Hang (2004) também reportaram contagens de células viáveis maiores que 8,0 Log UFC/mL em suco de tomate. Além disso, *L. acidophilus*, *L. plantarum*, *L. casei* e *L. delbrueckii* foram capazes de utilizar este suco rapidamente para a síntese celular, sem a suplementação de nutrientes. Em outro trabalho desses pesquisadores, a fermentação de beterraba por bactérias probióticas também foi investigada e neste substrato, os autores observaram uma sobrevivência celular de 10⁹ UFC/mL de suco após 48 horas de fermentação (YOON, WOODAMS, HANG 2005).

1.4 JUÇARA (*EUTERPE EDULIS*)

A juçara (*Euterpe edulis*), pertence a família Arecaceae e ao gênero Euterpe (Figura 2), conhecida popularmente como juçara, jiçara ou palmitero e contém aproximadamente 7 espécies distribuídas nos trópicos. No Brasil, está distribuída em áreas da Mata Atlântica, aparecendo principalmente nos estados do Rio Grande do Sul, Santa Catarina, Paraná, São Paulo, Rio de Janeiro, Minas Gerais e Bahia (BORGES et al., 2011; MARCOS; MATOS, 2003).

Estudos têm mostrado que o manejo sustentável desta planta torna-se necessário para a conservação da espécie, além de ser considerada uma estratégia rentável economicamente (MARCOS; MATOS, 2003), já que seus palmitos são amplamente consumidos no Brasil. Isto porque o palmitero juçara produz um tipo nobre de palmito, com alta qualidade e sabor superior quando comparado a outras espécies de *Euterpe* (BORGES et al., 2011).

Figura 2. O palmiteiro *Euterpe edulis* Mart.



Fonte: <http://arvores.brasil.nom.br/new/palmitojucara/index.htm>

Esta planta produz uma fruta redonda (Figura 3), conhecida também como juçara, contendo uma semente marrom clara com aproximadamente 90% do diâmetro da fruta (1 a 2 cm) e acima de 90% de seu peso (0,7-1,9%). As sementes são cobertas com uma polpa preta brilhosa. É uma fruta não-climatérica com período de colheita e produção variados de acordo com a origem geográfica e climática. Apesar da sua ampla distribuição no Brasil, a fruta da juçara é muito menos consumida do que a já conhecida fruta do açaí (*Euterpe oleracea*) (DE BRITO et al., 2007).

Considerando que a juçara é uma palmeira que corre o risco de extinção por causa da extração clandestina do palmito, o uso da fruta na alimentação humana, apresenta-se como uma alternativa de grande potencial econômico e ambiental, ao agregar valor aos remanescentes florestais da região e ao contribuir para a preservação da espécie (SILVA; BARRETTO; SERÔDIO, 2004). Quando utilizada, a fruta da juçara é frequentemente consumida como polpa e para isso, as bagas são normalmente maceradas com água e separadas de suas sementes para obter uma bebida espessa e roxa (BORGES et al., 2011).

Porém, para que a espécie garanta a sua regeneração, as sementes obtidas do despulpamento das frutas, devem retornar ao ambiente de origem sob forma de semeadura em pequenas covas ou a lanço (SILVA; BARRETTO; SERÔDIO, 2004).

Figura 3. Frutificação de juçara.



Fonte: <http://ibflorestas.org.br/loja/sementes/semente-palmito-juçara.html>

De acordo com Guimarães e Mascigrande (2011), a polpa obtida apresenta comportamento reológico de fluido pseudoplástico, sendo o teor de sólidos presente nas polpas o principal responsável pelo aumento no valor da viscosidade aparente do produto.

Por outro lado, um dos grandes problemas do comércio tanto da polpa do açaí quanto da juçara é a alta perecibilidade mesmo sob refrigeração, o que leva, atualmente, à conservação pelo processo de congelamento, elevando significativamente o custo do produto (ALEXANDRE; CUNHA; HUBINGER, 2004; ILLENSEER; PAULILO, 2002). Desta forma, outras alternativas têm surgido e podem ser aplicadas para reduzir os custos e desperdícios destes produtos. Entre estas, a produção da polpa de açaí em pó é uma alternativa já estudada, que torna o produto disponível durante o ano (ALEXANDRE; CUNHA; HUBINGER, 2004), e pode ser testada para polpa de juçara.

Além da importância ecológica, por servir de alimento para animais como jacutingas, jacus, tucanos, araçarís e sabiás, os frutos da juçara apresentam uma composição química rica em compostos bioativos com elevada capacidade antioxidante. De Brito et al. (2007), analisando o conteúdo de antocianinas de algumas frutas tropicais como a acerola (*Malpighia emarginata*), juçara (*Euterpe edulis*), jambolão (*Syzygium cumini*) e guajiru (*Chrysobalanus icaco*), encontraram a maior quantidade de antocianina na juçara (290mg / 100g de peso fresco). Neste

trabalho, os tipos de antocianinas também foram analisados, e os compostos mais significativos nesta fruta foram a cianidina-3-glicosídeo e cianidina-3-rutinosídeo (1358mg e 1565mg / 100g de peso seco respectivamente).

Em relação ao perfil de ácidos graxos, a juçara apresenta predominância de monoinsaturados, com variação de 44,63% a 55,61 para o ácido oleico, além de quantidades significativas de ácido linoleico (18% a 25%) e α -linolênico. Ácidos graxos saturados representam 24,32% a 29,89% do conteúdo total de lipídio com o ácido palmítico o principal constituinte (20% a 25%) (BORGES et al. 2011).

Entretanto, a composição química, o conteúdo de compostos bioativos, perfil de ácidos graxos e atividade antioxidante da fruta da juçara apresentam variação de acordo com a região de cultivo. As frutas cultivadas em regiões onde a colheita ocorre no verão apresentam maior conteúdo fenólico, antocianinas e atividade antioxidante do que as coletadas no inverno. Isto porque a maior incidência de radiação solar nas frutas apresenta efeito positivo na síntese das antocianinas (BORGES et al., 2011).

Apesar do potencial da fruta da juçara na alimentação humana, ainda há apenas poucos estudos na literatura avaliando seus efeitos em ensaios *in vitro* e *in vivo*. Borges et al., (2013) avaliaram o efeito protetor da polpa de juçara contra danos oxidativos em células Vero, e concluíram que mesmo em baixas concentrações (1,5 a 9 $\mu\text{g/mL}$), os extratos de juçara apresentaram efeito protetor significativo quando comparado ao padrão de ácido gálico. Felzenszwalb et. al., (2013) mostraram que a fruta da juçara não apresenta efeito toxicológico ou adverso, podendo, portanto, ser utilizada no desenvolvimento de novos medicamentos e cosméticos, e ser incorporada como ingrediente em muitos alimentos.

Em ensaios clínicos, Cardoso et al., (2015) analisaram a atividade antioxidante enzimática e não enzimática, em amostras de sangue de voluntários saudáveis antes e após 1, 2 e 4 h de consumo de suco de juçara, e observaram um aumento na capacidade antioxidante no soro através do método de redução de ferro (FRAP) após 1 h de consumo e um significativo aumento da atividade enzimática da glutathione peroxidase (GPx) após 2 h de consumo. Além disso estes autores observaram que a ingestão de apenas 1 dose de suco de juçara é capaz de diminuir a peroxidação lipídica em voluntários saudáveis.

1.5 ATIVIDADE ANTIOXIDANTE

1.5.1 Radicais Livres e Oxidação

Um radical livre é qualquer molécula orgânica ou inorgânica que contém um ou mais elétrons não pareados na sua última camada eletrônica, com existência independente, e que confere uma alta reatividade aos átomos ou moléculas (HALLIWELL, 1990). Como apresentam um elétron desemparelhado, tendem a se ligar a outros elétrons presentes em estruturas próximas, comportando-se como doadores ou receptores de elétrons (HALLIWELL et al., 1995).

Os radicais livres são formados em reações de óxido-redução. A redução de um elemento químico é definida como ganho de elétrons e a oxidação é definida como perda de elétrons. Uma substância que cede o elétron solitário oxida-se (agente redutor), e portanto, reduz outro reagente. Inversamente, a substância que recebe um elétron, reduz-se e causa a oxidação de outro produto (agente oxidante). A reação de oxirredução é usualmente empregada pelos organismos aeróbios, quando utilizam o oxigênio da atmosfera para oxidar os nutrientes fornecidos pelos alimentos para manutenção da vida (HALLIWELL, 1990; ARUOMA, 1998).

Como os radicais livres são provenientes, na sua grande maioria, do metabolismo do oxigênio, são normalmente chamados de espécies ativas de oxigênio (EAOs), ou espécies reativas de oxigênio (EROs) (ARUOMA, 1998), sendo os principais os radicais: superóxido ($O_2^{\cdot-}$), radical peroxila (ROO^{\cdot}), hidroxila (OH^{\cdot}); e os não radicalares: como peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e oxigênio singleto, entretanto existem outros radicais que não são centrados no oxigênio, como aqueles centrados no carbono (tetracloreto de carbono), no enxofre (compostos tióis) e no nitrogênio (óxido nítrico-NO) (ARUOMA, 1998; CAVALCANTE; BRUIN, 2009).

A maioria das espécies reativas fazem parte do metabolismo celular e, por isso estão presentes nos processos de produção de energia, regulação do crescimento celular, fagocitose, sinalização intracelular e síntese de hormônios e enzimas (CAVALCANTE; BRUIN, 2009). Entretanto há atualmente diversas evidências epidemiológicas de que o excesso de radicais livres pode causar vários danos em constituintes celulares como proteínas, DNA, carboidratos e lipídios, contribuindo para o desenvolvimento e evolução de diversas doenças, como

Alzheimer, Parkinson, artrite reumatoide, esclerose, cânceres além do envelhecimento (BORGES et al., 2013, FARIAS et al., 2014).

A oxidação lipídica é uma das principais reações deteriorativas que ocorre nas células e nos alimentos e é constituída de três fases principais: a iniciação, a propagação e a terminação e podem ocorrer devido à elevada exposição a fontes de energia, como calor ou radiação ionizante, ou através de reações redox catalisadas por metais de transição ou enzimas (FERRARI, 1998).

Em condições normais, o próprio organismo dispõe de um sistema antioxidante que combate os radicais livres formados, mas quando surge um desequilíbrio entre os sistemas pró e antioxidantes e uma habilidade insuficiente do sistema biológico em neutralizar a produção excessiva de radicais, ocorre o estresse oxidativo, que modifica o balanço redox, que causa danos às moléculas biológicas ou até mesmo a morte das células (TABART et al., 2012).

1.5.2 Antioxidantes e Compostos Fenólicos

Os antioxidantes são definidos como “qualquer substância que, quando presente em concentrações menores em relação às de um substrato oxidável, tem o potencial de retardar ou prevenir a oxidação daquele substrato”, incluindo no termo “substrato oxidável” quase tudo que é encontrado nos alimentos e nos tecidos vivos como proteínas, lipídios, carboidratos e DNA (HALLIWELL et al., 1995).

Esta definição enfatiza a importância em se escolher um agente antioxidante de acordo com a fonte de dano oxidativo, ou seja, onde a espécie reativa de oxigênio é gerada, como exemplo, em peroxidação lipídica, proteínas ou DNA, pois é muito possível que um antioxidante possa proteger um sistema mas falhar em proteger outros, ou ainda às vezes pode até causar danos e, antioxidantes que inibem a peroxidação lipídica podem não proteger outros alvos, como DNA e proteínas, além de poderem agravar ainda mais os danos causados, como o caso do antioxidante BHA (butylated hydroxyanisole), que é um potente inibidor da peroxidação lipídica, mas em certas quantidades pode induzir cânceres no estômago (HALLIWELL, 1990).

Conforme sua estrutura, os antioxidantes podem ser classificados em enzimáticos, aos quais se enquadram a enzima superóxido dismutase (SOD), a catalase e a glutatona peroxidase (GPx), e os não enzimáticos: como glutatona

reduzida (GSH) e compostos obtidos através da dieta (betacaroteno, flavonoides e vitaminas C e E) (CAVALCANTE; BRUIN, 2009).

A atividade dos antioxidantes frente aos radicais livres pode ser através do sequestro de radicais, atuando na inativação de espécies reativas; ou ligando-se aos radicais lipídicos já formados, interrompendo a fase de propagação. Além de doar átomos de hidrogênio aos radicais livres, os antioxidantes também podem atuar como quelantes de íons metálicos que também estão envolvidos na produção de ROS (CHAILLOU; NAZARENO, 2006).

Os antioxidantes são compostos que apresentam interesse tanto para a indústria de alimentos, devido a prevenção da rancidez lipídica, quanto interesse para biólogos e farmacêuticos, pois ajudam a prevenir no corpo humano danos ocasionados por espécies reativas de oxigênio (ROS) (HALLIWELL et al., 1995).

Entretanto nem todos os compostos propostos para inibir a deterioração oxidativa podem ser utilizados para consumo humano e por isso os órgãos regulamentadores preconizam as seguintes propriedades para uso: ausência de efeitos indesejáveis na cor, odor, sabor e em outras características do alimentos; deve ser eficaz em baixas concentrações; deve haver compatibilidade com o alimento e fácil aplicação; deve ser estável nas condições de processo e armazenamento e, não deve ser tóxico (RAMALHO; JORGE, 2006).

As principais fontes de compostos antioxidantes naturais da dieta são de origem vegetal e, com isso, o consumo de frutas, legumes e verduras tem aumentado significativamente, onde podem ser encontrados flavonóides, vitaminas E e C, carotenóides entre outros (RICE-EVANS; MILLER; PAGANÇA, 1996)

Os flavonóides são caracterizados estruturalmente como difenilpropanos com 15 átomos de carbono arranjados em três anéis e a estrutura química permite sua classificação em flavanonas, flavonas, flavonóis, catequinas, dihidroflavonóis, isoflavonas e antocianinas (Figura 4). Mais de 4000 flavonóides já foram identificados e as diferenças individuais presentes em cada grupo são resultado da variação no número e no arranjo dos grupos hidroxilas, assim como a natureza e a quantidade de glicosilações destes grupos. Quando apresentados na forma glicosilada, os carboidratos mais encontrados ligados a estes compostos são D-glicose, L-ramnose, glicoramnose, galactose e arabinose, e o sítio mais comum de glicosilação é a posição 3 e o menos frequente, a posição 7 (RICE-EVANS; MILLER; PAGANÇA, 1996).

As antocianinas são compostos fenólicos que pertencem ao grupo dos flavonóides que atuam como pigmentos naturais e são produzidas pelo metabolismo secundário de plantas (LEE; DURST; WROLSTAD, 2002). Quando ingeridos auxiliam no sistema de defesa, diminuindo a ação de radicais formados durante a respiração, oferecendo benefícios à pele, auxílio em problemas circulatórios entre outros (CASTROJÓN et al., 2008). Além das antocianinas, outros flavonóides como derivados de quercetina, ácidos fenólicos e proantocianidinas também apresentam este potencial (QIN; JIN; DONG, 2010).

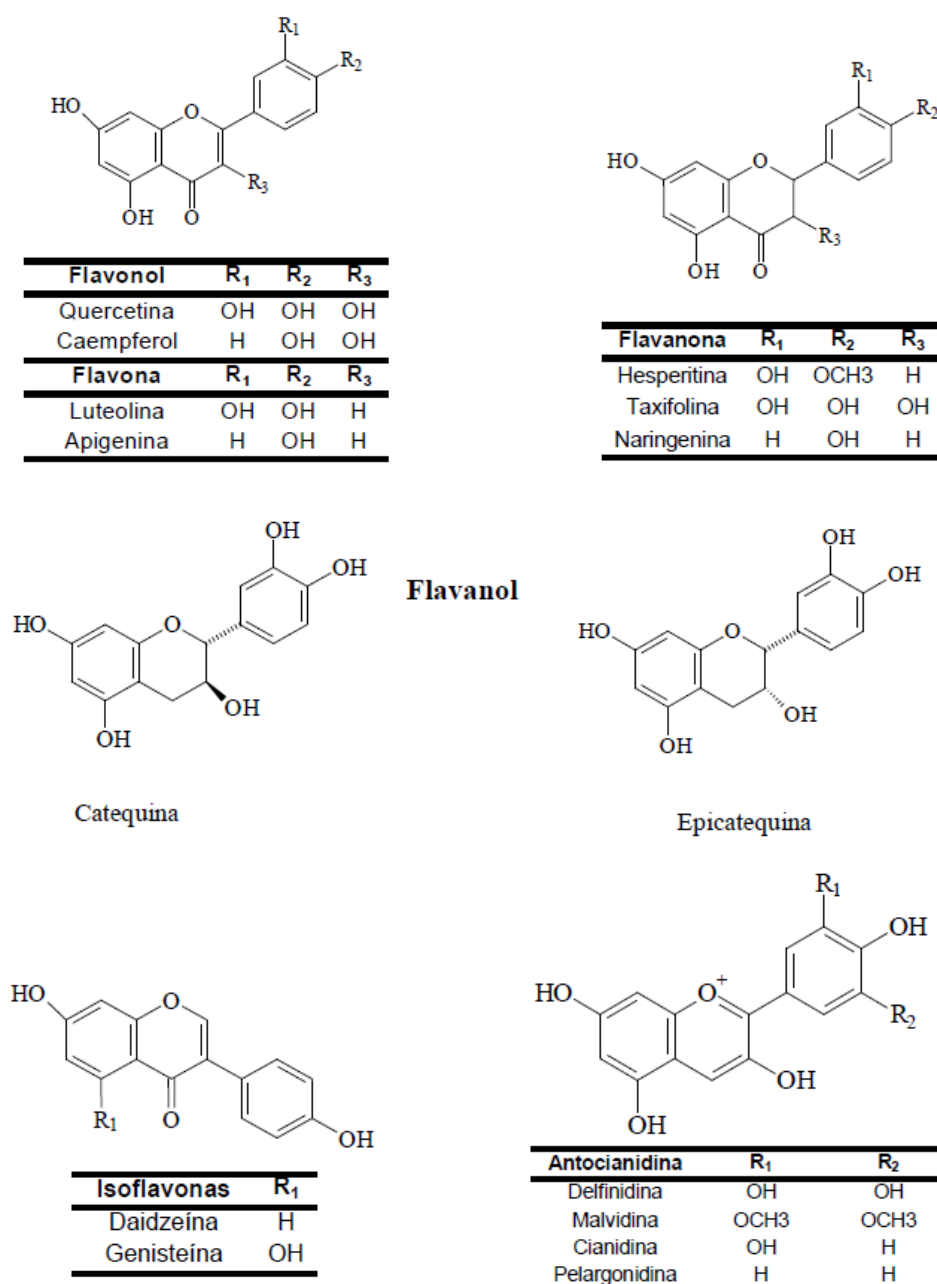
A atividade antioxidante dos flavonóides é devida à sua habilidade em sequestrar radicais livres, atuando como doadores de hidrogênio, e de quelar metais e, quando *in vivo*, agir elevando os níveis das defesas antioxidantes endógenas (HALLIWELL et al., 1995), reduzindo assim o potencial de ocorrência de doenças crônico-degenerativas (GARCÍA-ALONSO, 2004).

1.5.3 Metodologias de Análises.

A capacidade antioxidante total de extratos vegetais não traduz precisamente o que ocorre *in vivo* nas células já que nestas há uma dinâmica atividade formada por enzimas (superóxido dismutase, catalase, ascorbato redutase, etc) e compostos de baixo peso molecular, tais como flavonóides, taninos, ácidos cinâmicos, ácido ascórbico, tocoferol, antocianinas, entre outros (NEILL et al., 2002). Nesse contexto, a atividade antioxidante de derivados vegetais têm sido avaliadas por diferentes métodos, colorimétricos, biológicos e eletroquímicos, entre outros, envolvendo desde ensaios químicos com substratos lipídicos a ensaios mais complexos utilizando as mais diversas técnicas instrumentais (WOOD; GIBSON; GARG, 2006).

Porém, vale a pena mencionar que não existe um método universal com o qual esta atividade possa ser mesurada precisamente e quantitativamente. Por isso, recomenda-se ao menos dois ensaios combinados para proporcionar um resultado confiável da capacidade antioxidante de um gênero alimentício (GONÇALVES, 2008).

Figura 4. Estrutura química das principais classes de flavonóides distribuídos na natureza.



Fonte: GONÇALVES (2008).

De maneira geral, os métodos mais populares são: capacidade de absorção de radicais de oxigênio (ORAC), fotoquimiluminescência (PCL), quimiluminescência (CL), capacidade antioxidante total (TAC), capacidade antioxidante de Trolox-equivalente (TEAC) e poder antioxidante total usando Cu (II) (CUPRAC) (BARTOSZEK; POLAK, 2012). Estes métodos diferem entre si pelo princípio de

reação e condições experimentais, moléculas-alvo e modo de expressar os resultados (PRIOR; WU; SCHAICH, 2005).

O teste de DPPH• (2,2-difenil-1-picril-hidrazina) é um dos métodos indiretos mais utilizados para se determinar a atividade antioxidante em extratos e substâncias isoladas como compostos fenólicos, fenilpropanóis, fenólicos totais, flavonóis, antocianinas, etc (LEJA et al., 2007; ROGINSKY; LISSI, 2005), e está baseado no princípio de que o radical DPPH• aceita um átomo de hidrogênio (H) a partir da molécula capturante, como exemplo, o antioxidante presente no alimento, resultando na redução do DPPH• em DPPH₂, o que causa a mudança da cor da solução de púrpura para amarelo com uma diminuição concomitante na absorvância (BARTOSZEK; POLAK, 2012). Apresenta a vantagem de ser um método simples, preciso e reprodutivo, entretanto seus resultados devem ser cuidadosamente interpretados, pois as substâncias analisadas podem interferir nos resultados (ALVES et al., 2010; PRIOR; WU; SCHAICH, 2005).

O estudo da atividade antioxidante de um composto em sistemas de cultivo celulares, como o “burst” de neutrófilos, fornece informações importantes que podem elucidar o mecanismo de estresse oxidativo em relação ao efeito antioxidante (FARIAS et al., 2014). Esta técnica está baseada na quimiluminescência, na qual o radical oxidante, juntamente com um composto marcador, produz espécies em estado excitado que emitem luz. A quimiluminescência é caracterizada por uma intensidade de emissão de luz muito baixa, o que torna a técnica muito sensível, fornecendo respostas abaixo do limite de detecção de muitas análises químicas (PRIOR; WU; SCHAICH, 2005). Além disso, estes estudos têm sido utilizados para pesquisas sobre antioxidantes antes de estudos em animais e humanos (FARIAS et al., 2014).

A espectroscopia de ressonância paramagnética eletrônica (RPE) é uma técnica baseada na detecção e caracterização de moléculas com elétrons desemparelhados, e é a única técnica analítica que pode especificadamente detectar radicais livres (BARTOSZEK; POLAK, 2012). Isto porque os elétrons de uma molécula se distribuem em orbitais, podendo cada orbital possuir até dois elétrons com spins opostos. O spin de um elétron descreve o seu comportamento em um campo magnético, girando em torno do seu eixo no sentido horário ou anti-horário. Quando o orbital tem um único elétron, diz-se que este é desemparelhado (BARTOSZEK; POLAK, 2012).

1.6 DESIDRATAÇÃO DE ALIMENTOS

A água é um dos principais componentes de muitos produtos e por isso, em certa quantidade, e dependendo da localização e orientação das moléculas, pode influenciar profundamente a estrutura, aparência, sabor e estabilidade dos alimentos (FENNEMA, 1997). Em um material biológico, as propriedades da água podem ser classificadas em estruturais, dinâmicas ou termodinâmicas, que estão relacionadas a posição e orientação das moléculas, ao movimento e contribuições às propriedades hidrodinâmicas do sistema e, ao equilíbrio da água com os compostos envolventes, em determinada umidade relativa e temperatura (AL-MUHTASER; McMINN; MAGEE, 2002).

A água pode estar com a mobilidade livre ou impedida, e portanto é referida como água livre ou ligada, respectivamente (AL-MUHTASEB; McMINN; MAGEE, 2002). O teor e componentes aos quais esteja ligada, estão diretamente relacionados a reações microbiológicas, químicas e físicas, tornando o seu controle durante o processamento de alimentos um dos métodos mais antigos de preservação (DUCKWORTH, 1975).

Por muitos anos o conceito de atividade de água (A_w) tem sido considerado mais importante do que a quantidade total de água em um produto alimentício, pois inclui a medida da pressão de vapor d'água que representa a disponibilidade para o crescimento de micro-organismos, reações de oxidação, atividade enzimática entre outros, o que o torna este parâmetro importante para todo o tipo de processamento e conservação (Figura 5) (PARK et al., 2007).

No equilíbrio, a atividade de água está relacionada a umidade relativa da atmosfera ambiente pela equação:

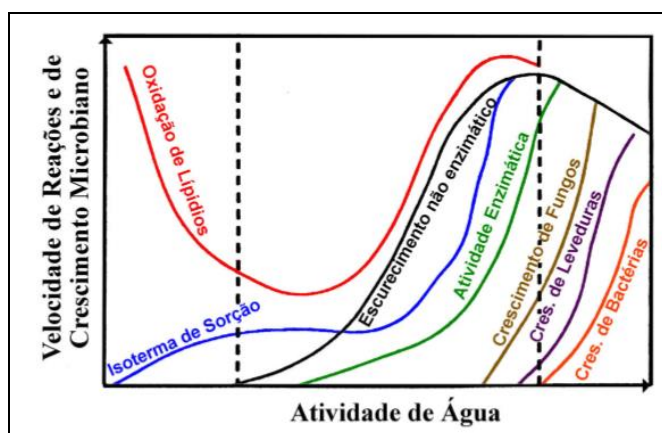
$$a_w = p/p_0 = \text{umidade relativa (\%)} / 100$$

onde p é a pressão de vapor exercida pelo alimento, p_0 a pressão de vapor da água pura na temperatura T_0 , que é a temperatura de equilíbrio do sistema (IGLESIAS; CHIRIFE, 1982).

A relação entre o conteúdo de umidade total e a atividade de água (a_w) de um alimento em temperatura e pressão constantes pode ser descrita em gráficos conhecidos como *isotermas de sorção* (IGLESIAS; CHIRIFE, 1982), os quais

forneem importantes informações sobre estabilidade microbiológica e físico-química dos alimentos em operações de processamento como secagem, embalagem e estocagem (ROCKLAND; STEWARD, 1981).

Figura 2. Velocidade relativa de reações em função da atividade de água.



Fonte: PARK et al. (2007)

O processo de secagem de alimentos e bioprodutos, envolve a remoção da água a partir dos materiais e consequente formação de vapor. É um dos métodos mais antigos de preservação que resulta em produtos estáveis ao armazenamento e podem ser mantidos em boas condições por meses ou até mesmo anos em temperatura ambiente. Técnicas de secagem podem ser categorizadas com base em métodos empregados de aquecimento adicional e remoção de vapor d'água e podem ser facilitadas pelo contato direto com o ar quente na pressão atmosférica, como é o caso do *spray drying* ou a sublimação da água no caso de produtos congelados na técnica de liofilização (ISHWARYA; ANANDHARAMAKRISHNAN; STAPLEY, 2015) sob vácuo.

1.6.1 Spray-Drying

A secagem por *spray-drying* vem sendo utilizada há décadas em diversos processos industriais para a obtenção de materiais desidratados na forma de pó. As primeiras descrições do processo datam de 1860, sendo a primeira patente realizada em 1872. Entretanto somente a partir de 1930 ocorre um aumento considerável de

produtos atomizados, especialmente com o aparecimento do leite em pó, cafés solúveis e ovo em pó (TAN et al., 2011).

Esta técnica consiste na transformação de um produto no estado fluido para o estado sólido em forma de pó. No spray dryer, o produto é pulverizado em finas gotas formando uma névoa, que entra em contato com uma corrente de ar quente, e, por sua vez, atua como fluido aquecedor e como veículo transportador de umidade. A imediata evaporação transforma as gotas líquidas em partículas sólidas que são separadas mediante um ciclone primário que se forma na saída da câmara de secagem. Através de uma ventilação de aspiração apropriada, um ciclone secundário recupera as partículas mais finas que tendem a permanecer em suspensão no recinto de secagem (BHANDARI; PATEL; CHEN, 2008).

O pequeno tempo de residência dos produtos no interior da câmara de secagem, faz com o que a secagem por spray drying seja adequada para o processamento de materiais sensíveis, incluindo materiais farmacêuticos e biológicos (TONON et al., 2008) e os pós desidratados por este método apresentam maior tempo de prateleira e se assemelham ao líquido original em relação à qualidade e deve reunir características como facilidade de reconstituição, degradação mínima dos constituintes e sabor agradável (TAN et al., 2011).

As propriedades físico-químicas do pó produzido por spray-drying dependem de algumas variáveis do processo como as características do líquido de alimentação (viscosidade, tamanho da partícula e vazão) e do ar de secagem (temperatura, pressão) bem como o tipo do atomizador (TONON et al., 2008). As propriedades instantâneas (penetração, molhabilidade, dispersibilidade e solubilidade) são influenciadas pela natureza dos alimentos (teor de sólidos, viscosidade e temperatura), tipo de spray dryer, velocidade de secagem e pressão operacionais, condições operacionais do secador (GOULA; ADAMOPOULOS; KAZAKIS, 2004)

Chegeni, Ghobadian (2005) e Quek, Chok, Swedlund (2007) reportaram que o aumento na temperatura de entrada do spray, ocasiona a diminuição da solubilidade de suco de laranja e melão em pó, devido provavelmente a formação de uma rígida camada na superfície da partícula do pó, que impede a difusão das moléculas de água para seu interior.

Os produtos alimentícios atomizados podem ser classificados em dois grupos: pegajoso (*sticky*) e não pegajoso (*nonsticky*). Entre os produtos classificados como *nonsticky* estão o leite e ovo em pó, os quais podem ser secos usando um simples

secador. Sucos de frutas e vegetais em pó, mel em pó e lactose em pó pertencem aos produtos considerados *sticky*. Sob condições normais, estes produtos são mais difíceis de serem submetidos a secagem por spray-drying devido ao alto teor de açúcares (sacarose, glicose, lactose e frutose) e ácidos orgânicos (ácido cítrico, málico e tartárico (TAN et al., 2011).

A qualidade dos produtos secos por spray, depende fortemente dos parâmetros de processo, sendo o conteúdo de umidade um dos fatores mais determinantes na qualidade dos produtos. Para os produtos não pegajosos (*nonsticky*) como os pós de leite e ovos, o conteúdo final de umidade deve ser menor que 5 % e de 4 a 9% respectivamente. Ao contrário, o conteúdo de umidade final para produtos pegajosos (*sticky*) como suco de frutas em pó fica em torno de 2 a 4% (TAN et al., 2011).

De forma geral, o conteúdo de umidade de produtos atomizados está diretamente relacionado à temperatura que o ar deixa a câmara de secagem. Menores conteúdos de umidade podem ser obtidos através do aumento da temperatura de saída do ar e/ou aumentando o tempo de residência do produto no interior da câmara de secagem. Entretanto, a exposição a altas temperaturas de substâncias sensíveis por longos períodos pode levar a degradação do produto, tornando o controle das condições de processo de extrema importância (FANG; BHANDARI, 2011). Além disso, o controle da deposição de partículas no interior da câmara de secagem é um problema prevaiente no processo por atomização (KESHANI et al., 2015)

Uma das técnicas utilizadas com sucesso para a desidratação de alimentos com altos teores de açúcar por spray-drying é o aumento da Temperatura de Transição Vitrea (T_g) do material a ser atomizado (TONON et al., 2009).

Este parâmetro é considerado referência para as indústrias de alimentos, pois os produtos alimentícios em pó, que contém carboidratos amorfos, podem passar por mudanças físicas, tais como: cristalização, pegajosidade e compactação durante o processamento, manipulação e estocagem (ROOS, 2010). E como a matriz amorfa pode existir como um material vítreo muito viscoso ou como uma estrutura amorfa “gomosa”, devido ao aumento da mobilidade e diminuição da viscosidade, esta mudança do estado vítreo para o estado “gomoso”, ocorre na temperatura de transição vítrea (T_g) e é específica para cada tipo de material (JULIANO; BARBOSA-CÁNOVAS, 2010; ROOS, 2010). Desta forma, a temperatura de transição vítrea é

considerada como referência onde abaixo da Tg é esperado que o alimento seja mais estável e acima desta temperatura, a diferença entre a Tg e a temperatura de estocagem é responsável por controlar as mudanças que possam ocorrer (JULIANO; BARBOSA-CÁNOVAS, 2010).

Uma forma de aumentar a Tg e assim evitar problemas de pegajosidade do pó é a adição de polímeros de alto peso molecular, que possuem uma alta temperatura de transição vítrea (TONON et al., 2009). Além de aumentar a Tg e reduzir a higroscopicidade do pó (CANO-CHAUCA et al., 2005), o emprego destes aditivos na atomização de sucos de frutas, pode proteger componentes sensíveis dos alimentos contra condições ambientais desfavoráveis, mascarar ou preservar *flavors* e aromas, aumentar o rendimento do produto obtido, reduzir a volatilidade e reatividade e prover atratividade adicional aos produtos alimentícios (CHEGINI; GHOBADIAN, 2005; TONON et al., 2009).

Entre os materiais utilizados para aumentar a Tg estão carboidratos (amidos, maltodextrinas, dextranas, sacarose, celulose e derivados), gomas (goma acácia, agar, carragena, etc), lipídeos (ceras, parafinas, etc), proteínas (gelatinas, albuminas, caseínas e peptídeos) e leite desnatado (GOULA; ADAMAPOULOS, 2008; MESTRY; MUJUMDAR; THORAT, 2011; NADEEM; TORUN; OZDEMIR, 2011; RAJABI et al., 2015).

1.6.2 Desidratação de Probióticos

A maioria das culturas probióticas líquidas e congeladas necessitam da cadeia do frio para armazenamento e distribuição, aumentando assim custos na difusão de sua utilização (MENG et al., 2007). Desta forma, a desidratação aponta como uma alternativa para a o emprego de probióticos e assim facilitar a estocagem, manuseio, transporte e subsequente uso e aplicações em alimentos funcionais (SANTIVARANGKA; KULOZIK; FOERST, 2008).

A técnica de spray drying tem sido muito utilizada para desidratação e microencapsulação de probióticos, por ser um método rápido com alto rendimento e menores custos em relação à outras técnicas como a liofilização (GOLOWCZYC et al., 2011) e embora muitos trabalhos envolvendo a atomização de bactérias lácticas tenham sido publicados, há apenas poucos estudos avaliando a desidratação de

probióticos em suco de frutas (MESTRY; MUJUMDAR; THORAT, 2011; PEREIRA et al., 2014).

A principal desvantagem da utilização da secagem por spray-drying, é a exposição dos micro-organismos à elevadas temperaturas de processo que, juntamente aos danos ocasionados pela remoção da água, podem ser prejudiciais para a integridade das células (GARDINER et al., 2000; TEIXEIRA et al., 1997). Como a viabilidade e atividade das bactérias é um importante parâmetro para se obter os efeitos benéficos, juntamente à manutenção da qualidade dos produtos obtidos, as condições de processo devem ser avaliadas e empregadas com cuidado (KEARNEY et al., 2009; PEIGHAMBARDoust; GOLSHAN; HESARI, 2011).

De acordo com diversos estudos, a temperatura na qual o produto deixa a câmara de secagem (temperatura de saída maior que 80 °C) durante o processamento, é o principal parâmetro que afeta a viabilidade de culturas probióticas atomizadas (ANANTA; VOLKERT; KNORR, 2005; ANEKELLA; ORSAT, 2013; DESMOND et al., 2002). Entretanto outras condições de processo como alta temperatura de entrada, fluxo da bomba de alimentação, e conteúdo de sólidos podem também reduzir a viabilidade das bactérias lácticas (GARDINER et al., 2000; GUERGOLETTTO et al., 2012).

Segundo Peighambardoust, Golshan e Hesari (2011), as altas temperaturas de entrada podem exercer apenas um pequeno efeito na inativação celular. Isto porque a extensão da inativação depende também da combinação temperatura e tempo, que podem ser divididas em dois períodos durante a secagem por spray-drying. No período de secagem constante, a evaporação é rápida e a temperatura de bulbo úmido protege as células das altas temperatura no secador, entretanto durante o período de queda, ou seja, após a secagem constante, a superfície da partícula se torna seca, deixando a temperatura do produto elevada. Durante esta etapa a extensão da inativação térmica dependerá dos parâmetros de secagem como temperatura de saída, tempo de residência e taxa de alimentação.

Diversos estudos têm tentado descrever os mecanismos de inativação celular durante o processo de secagem, e embora ainda não estejam completamente elucidados, acredita-se que a principal causa esteja relacionada à deterioração e oxidação da parede celular (LESLIE et al., 1995), desnaturação de componentes como o DNA e RNA (LIEVENSE et al., 1994; LINDERS et al., 1997). Segundo Corcoran et al. (2004) as bactérias podem sofrer danos principalmente em sua

membrana plasmática devido às altas temperaturas utilizadas no processo e além disso, parte dos micro-organismos sobreviventes podem sofrer injúria sub-letal sendo viáveis logo após a secagem, porém mais sensíveis às condições de estocagem.

Dessa forma, os danos causados nas células probióticas desidratadas durante a secagem, podem ser agravados durante o armazenamento, isto porque a razão ácidos graxos insaturados/saturados da membrana lipídica diminui consideravelmente, evidenciando danos ocasionados por oxidação lipídica, resultando em algumas mudanças físicas nas funções e estrutura da membrana (SANTIVARANGKNA; KULOZIK; FOERST, 2008; WANG; YU; CHOU, 2004).

O aumento na proporção ácido graxos saturados causa um aumento na temperatura de transição vítrea e conseqüentemente uma diminuição na fluidez da membrana e aumento do vazamento de compostos através da membrana durante a reidratação (TEIXEIRA et al., 1997). Outra consequência de oxidações biológicas é a formação de radicais livres que podem reduzir a hidrofobicidade de ácidos graxos devido à introdução de grupos hidrofílicos, enfraquecendo a interação hidrofóbica com as proteínas da membrana (SANTIVARANGKNA; KULOZIK; FOERST, 2008).

Diferentes abordagens podem ser usadas para a avaliação da sobrevivência ou atividade das células desidratadas e entre elas, podem ser citadas a determinação da viabilidade celular propriamente dita, a determinação da capacidade metabólica e a determinação da habilidade dos microrganismos em tolerar condições ambientais estressantes como acidez e bile (FU; CHEN, 2011).

Para aumentar a viabilidade celular durante e após processo de desidratação, algumas estratégias podem ser utilizadas. Entre estas estão fatores da fisiologia celular e fatores externos (SANTIVARANGKNA; KULOZIK; FOERST, 2008; SANTIVARANGKNA; HIGL; FOERST, 2008).

Como exemplos de fatores que envolvem a fisiologia do micro-organismo, estão a fase de crescimento à qual a bactéria é submetida ao processo, sendo a fase estacionária a que apresenta maior resistência (MENG et al., 2007); a composição do meio de crescimento, modificação genética das linhagens probióticas e aplicação de condições de estresse suave antes da desidratação, entre outros (SANTIVARANGKA; HIGL; FOERST, 2008). Estudos mostraram que células que crescem em um meio de pH não controlado, como a fermentação, podem conferir uma resistência adicional durante os processos de desidratação e calor, isto porque

o estress ácido pode induzir a produção de proteínas para a adaptação celular em várias outras condições de estress (SILVA et al., 2005), entretanto este fator pode ser altamente dependente da espécie (BAUER et al., 2012).

Uma variedade de protetores celulares, ou chamados solutos compatíveis, podem ser adicionados ao meio para manter a viabilidade do organismo probiótico durante o congelamento e/ou secagem. Este fenômeno, chamado de anidrobiose, tem recebido a atenção de muitos pesquisadores, e carboidratos como a trealose, sacarose, glicose e lactose, são adicionados ao substrato antes da fermentação, para auxiliar na adaptação dos probióticos ao ambiente, ou são misturados diretamente com a biomassa bacteriana previamente ao processo de secagem (CAPELA; HAY; SHAH, 2006; SANTIVARANGKNA; KULOZIK; FOERST, 2006).

Além destes, uma das técnicas utilizadas com sucesso para a encapsulação e desidratação de micro-organismos por spray-drying, é o uso de polímeros de alto peso molecular, os chamados agentes carreadores de secagem, como a goma acácia, maltodextrina, gelatina, soro de leite, etc. Estes compostos além de aumentarem a temperatura de transição vítrea (T_g) do material a ser atomizado, podem encapsular as células dentro das partículas e assim protege-las contra as condições ambientais desfavoráveis durante o processamento (MENG et al., 2007; TONON; BRABET; HUBINGER, 2008).

Diversos estudos podem ser encontrados na literatura avaliando o efeito destes agentes como carreadores e protetores de compostos e micro-organismos durante secagem (JANTZEN; GÖPEL; BEERMANN, 2015; MESTRY; MUJUMDAR; THORAT, 2011; PEREIRA et al., 2014;). Desmond et al. (2002) avaliaram o uso de diferentes porcentagens de goma acácia na secagem de *L. paracasei* NFBC 338 desidratado por spray-dryer e obtiveram um aumento de 10% na sobrevivência do micro-organismo após o processo de secagem, em relação ao tratamento sem adição do polímero. Lian, Hsiao e Chou (2002), obtiveram altas sobrevivências de bifidobactérias desidratadas por spray dryer quando utilizaram 10 % (p/p) de gelatina, goma acácia ou amido solúvel. Entretanto a escolha do agente e sua concentração deve ser avaliada em cada caso, pois variações de viabilidades são observadas de acordo com o tipo de agente, espécie bacteriana e condições de secagem.

1.7 REFERÊNCIAS

- AKIRA, S.; TAKEDA, K.; KAISHO, T. Toll-like receptors: Critical proteins linking innate and acquired immunity. **Nature Immunology**, v. 2, p. 575-680, 2001.
- AL-MUHTASEB, A. H.; McMINN, W. A. M.; MAGEE, T. R. Moisture sorption isotherm characteristic of food products: a review. **Trans IChemE**, v. 80, part C, 2002.
- ALEXANDRE, D.; CUNHA, R. L.; HUBINGER, M. D. Conservação do Açaí pela tecnologia de obstáculos. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 24, n. 1, p. 114-119, 2004.
- ALVES, C. Q.; DAVID, J. M.; DAVID, J. P.; BAHIA, M. V.; AGUIAR, R. M. Métodos para determinação de atividade antioxidante in vitro em substratos orgânicos. **Química Nova**, v. 33, n. 10, p. 2202-2210, 2010.
- ANANTA, E.; VOLKERT, M.; KNORR, D. Cellular injuries and storage stability of spray-dried *Lactobacillus rhamnosus* GG. **International Dairy Journal**, v. 15, p. 399-409, 2005.
- ANEKELLA, K.; ORSAT, V. Optimization of microencapsulation of probiotics in raspberry juice by spray drying. **LWT – Food Science and Technology**, v. 50, p. 17-24, 2013.
- ARUOMA, O. I. Free radicals, oxidative stress, and antioxidants in human health and disease. **Journal of the American Oil Chemist's Society**, v. 75, n. 2, p. 199-212, 1998.
- BARTOSZEK, M.; POLAK, J. An electron paramagnetic resonance study of antioxidant properties of alcoholic beverages. **Food Chemistry**, v. 132, p. 1089-1093, 2012.
- BASSAGANYA-RIERA, J.; VILADOMIU, M.; PEDRAGOSA, M.; DE SIMONE, C.; HONTECILLAS, R.; H.; GERGINA, L. Immunoregulatory mechanisms underlying prevention of colitis-associated colorectal cancer by probiotic bacteria. **Plos One**, v. 7, n. 4, 2012.
- BAUER, S. A. W.; SCHNEIDER, S.; BEHR, J.; KULOZIK, U.; FOERST, P. Combined influence of fermentation and drying conditions on survival and metabolic activity of starter and probiotic cultures after low-temperature vacuum drying. **Journal of Biotechnology**, v. 159, p. 351-357, 2012.
- BHANDARI, B. R.; PATEL, K. C.; CHEN, X. D. 2008. Spray drying of foods materials-process and products characteristics. IN Chen X. D.; Mujundar, A. S. (Eds). **Drying Technologies in Food Processing**, Blackwell, Oxford.
- BORGES, G. S. da C.; VIEIRA, F. G. K.; COPETTI, C.; GONZAGA, L. V.; ZAMBIAZI, R. C.; FILHO, J. M.; FETT, R. Chemical characterization, bioactive compounds, and

antioxidant capacity of Jussara (*Euterpe edulis*) fruit from the Atlantic Forest in southern Brazil. **Food Research International**, v. 44, p. 2128-2133, 2011.

BORGES, G. S. da C.; GONZAGA, I. V.; JARDINI, F. A.; FILHO, J. M.; HELLER, M.; MICKE, G.; COSTA, A. C. O.; FETT, R. Protective effects of *Euterpe edulis* M. on Vero cell culture and antioxidant evaluation based on phenolic composition using HPLC-ESI-MS/MS. **Food Research International**, v. 51, p. 363-369, 2013.

BRASIL, Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução nº 2, de 07 de janeiro de 2002. <http://www.anvisa.gov.br/e-legis/>

BRASIL, Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Alimentos com Alegações de Propriedades Funcionais e ou de Saúde, Novos Alimentos/Ingredientes, Substâncias Bioativas e Probióticos - IX Lista de alegações de propriedade funcional aprovados. Julho, 2008. <http://www.anvisa.gov.br>
Acesso em 07/09/2015.

CANO-CHAUCA, M.; STRINGHETA, P. C.; RAMOS, A. M.; CAL-VIDAL, J. Effect of the carriers on the microstructure of mango powder obtained by spray drying and its functional characterization. **Innovative Food Science and Emerging Technologies**, v. 6, p. 420-428, 2005.

CAPELA, P.; HAY, T.K.C.; SHAH, N.P. Effect of cryoprotectants, prebiotics and microencapsulation on survival of probiotic organisms in yoghurt and freeze-dried yoghurt. **Food Research International**, v. 39, n. 39, p. 203-211, 2006.

CARDONA, F.; ANDRES-LACUERVA, C.; TULIPANIA, S.; TINAHONESB, F. J.; QUEIPO-ORTUNO, M. I. Benefits of polyphenols on gut microbiota and implications in human health. **Journal of Nutritional Biochemistry**, v. 24, p. 1415-1422, 2013.

CARDOSO, A. L.; DI PIETRO, P. F.; VIEIRA, F. G. K.; BOAVENTURA, B. C. B.; LIZ, S. de; BORGES, G. S. da C.; FETT, R.; ANDRADE, D. F. de; SILVA da, E. L. Acute consumption of juçara juice (*Euterpe edulis*) and antioxidant activity in healthy individuals. **Journal of Functional Foods**, v. 17, p. 151-161, 2015.

CASTREJÓN, A. D. R.; EICHHOLZ, I.; ROHN, S.; KROH, L. W.; HUYSKENS-KEIL, S. Phenolic profile and antioxidant activity of highbush blueberry (*Vaccinium corymbosum* L.) during fruit maturation and ripening. **Food Chemistry**, v.109, 564 – 562, 2008.

CAVALCANTE, A. G. M.; BRUIN, P. F. C. O papel do estresse oxidativo na DPOC: conceitos atuais e perspectivas. **Jornal Brasileiro de Pneumologia**, v. 35, n. 12, p. 1227-1237, 2009.

CHAILLOU, L. L.; NAZARENO, M. A. New method to determine antioxidant activity of polyphenols. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, v. 54, p. 8397-8402, 2006.

CHAMBERS, E. S.; VIADORT, A.; PSICHAS, A.; MORRISON, D. J.; MURPHY, K. G.; ZAC-VARGHESES, S. E. K.; MACDOUGALL, K.; PRESTON, T.; TEDFORD, C.; FINLAYSON, G. S.; BLUNDELL, J. E.; BELL, J. D.; THOMAS, E. L.; MT-ISA, S.; ASHBY, D.; GIBSON, G. R.; KOLIDA, S.; SHILLO, W. S.; BLOMM, S.; MORLEY, W.; CLEGG, S.; FROST, G. (2014). Effects of targeted delivery of propionate to the human colon on appetite regulation, body weight maintenance and adiposity in overweight adults. **Gut**, p. 1–11. doi:10.1136/gutjnl-2014-307913, 2014.

CHARALAPOMPOULOS, D.; PANDIELLA, S. S.; WEBB, C. Evaluation of the effect of malt, wheat and barley extracts on the viability of potential probiotic lactic acid bacteria under acidic conditions. **International Journal of Food Microbiology**, v. 82, p. 133-141, 2003.

CHEN, S.; CAO, Y.; FERGUSON, L. R.; SHU, Q.; GARG, S. The effect of immobilization of probiotic *Lactobacillus reuteri* DPC16 in sub-100 µm microcapsule on food-borne pathogens. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 28, p. 2447-2452, 2012.

CHEGENI, G. R.; GHOBADIAN, B. Effect of spray-drying conditions on physical properties of orange juice powder. **Drying Technology**, v. 23, p. 657-668, 2005.

COCCORULLO, P.; STRISCIUGLIO, C.; MARTINELLI, M.; MIELE, E.; GRECO, L.; STAIANO, A. *Lactobacillus reuteri* (DSM 17938) in infants with functional chronic constipation: a double-blind, randomized, placebo-controlled study. **Journal of Pediatrics**, v. 157, p. 598-602, 2010.

CORCORAN, B. M.; ROSS, R. P.; FITZGERALD, G. F.; STANTON, C. Comparative survival of probiotic lactobacilli spray-dried in presence of prebiotics substances. **Journal of Applied Microbiology**, v. 96, p. 1024-1039, 2004.

CORTHÉSY, B.; GASKINS, H. R.; MERCENIER, A. Cross-talk between probiotic bacteria and the host immune system. **Journal of Nutrition**, v. 137, p. 781S-790S, 2007.

COSTA, G. N.; MARCELINO-GUIMARÃES, F. C.; VILAS-BOAS, G. T.; MATSUO, T.; MIGLIORANZA, L. H. S. Potential Fate of Ingested *Lactobacillus plantarum* and its occurrence in human feces. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 80, n. 3, p. 1013-1019, 2014.

COUDRAY, C.; RAMBEAU, M.; FEILLET-COUDRAY, C.; TRESSOL, J. C.; DEMIGNE, C.; GUEUX, E.; MAZUR, A.; RAYSSIGUIER, Y. Dietary inulin intake and age can significantly affect intestinal absorption of calcium and magnesium in rats: a stable isotope approach. **Nutrition Journal**, v. 4, n.29, p. 117-122, 2005.

CUMMINGS, J. H.; MACFARLANE, G. T. The control and consequences of bacterial fermentation in the human colon – a review. **Journal of Applied Microbiology**, v.70, p. 443-459, 1991.

DE BRITO, E. S.; DE ARAÚJO, M. C. P.; ALVES, R. E.; CARKEET, C.; CLEVIDENCE, B. A.; NOYOTNY, J. A. Anthocyanins present in selected tropical fruits: Acerola, Jambolão, Jussara, and Guajiru. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 55, p. 9389-9394, 2007.

DESMOND, C.; ROSS, R. P.; O'CALLAGHAN, E.; FITZGERALD, G.; STANTON, C. Improved survival of *Lactobacillus paracasei* NFBC 338 in spray-dried powders containing gum acacia. **Journal of Applied Microbiology**, v. 93, p. 1003-1011, 2002.

DINLEYICI, E.; DALGIC, N.; GUVEN, S.; OZEN, M.; KARA, A.; ARICA, V.; METINTIMUR, O.; SANCAR, M.; KURUGOL, Z.; TANIR, G.; OZTURK, D.; AYDOGDU, S.; TUTANC, M.; EREN, M.; VANDENPLAS, Y. The effect of a multispecies symbiotic mixture on the duration of diarrhea and length of hospital stay in children with acute diarrhea in Turkey: Single blinded randomized study. **European Journal of Pediatrics**, v. 172, n. 4, p. 459-464, 2013.

DIRIENZO, D. B.; Effect of probiotics on biomarkers of cardiovascular disease: implications for heart-healthy diets. **Nutrition Reviews**, v. 72, n. 1, p. 18-29, 2014.

DUCKWORTH, R. B. **Water relations of food**. New York: Academic Press Inc, 1975, 716 p.

FANG, Z.; BHANDARI, B. Effect os spray drying and storage on the stability of bayberry polyphenols. **Food Chemistry**, v. 129, p. 1139-1147, 2011.

FAO Food and Nutrition paper 85. **Probiotics in food - Health and nutritional properties and guidelines for evaluation**. Report of a Joint FAO-WHO working group on drafting guidelines for the evaluation of probiotics in food. Ontario, Canadá, 2002.

FARIAS, C. C. de; BONIFÁCIO, K. L.; MATSUMOTO, A. K.; HIGACHI, L.; MOREIRA, E. G.; BARBOSA, D. S. Comparison of the antioxidant potential of antiparkinsonian drugs in different *in vitro* models. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 50, n. 4, p. 820-826, 2014.

FELZENSZWALB, I.; MARQUES, M. R. C.; MAZZEI, J. L.; AIUB, C. A. F. Toxicological evaluation of *Euterpe edulis*: A potential superfruit to be considered. **Food and Chemical Toxicology: An International Journal Published for the British Industrial Biological Research Association**, v. 58, p. 536-544, 2013.

FENNEMA, O. R. **Food Chemistry**. 3 ed. New York: Marcel Dekker Inc, 1997, 1261 p.

FERRARI, C. K. B. Oxidação lipídica em alimentos e sistemas biológicos: mecanismos gerais e implicações nutricionais e patológicas. **Revista de Nutrição**, v. 11, n. 1, p. 3-14, 1998.

FIGUEROLA, F.; HURTADO, M. L.; ESTÉVEZ, A. M.; CHIFFELLE, I.; ASENJO, F. Fibre concentrates from apple pomace and citrus peel as potential fibre sources for food enrichment. **Food Chemistry**, v.91, p. 395-401, 2005.

FOOD INGREDIENTS BRASIL. Alimentos vs. doenças. *Revista Food Ingredients Brasil*, v. 12, fev – mar, 2010. www.revista-fi.com. Acesso em: 01 de junho de 2012.

FU, N.; CHEN, X. D. Towards a maximal cell survival in convective thermal drying process. **Food Research International**, v. 44, p. 1127-1149, 2011.

FULLER, R. **Probiotics. The scientific basis**. 1ª Ed., Londres, 1992.

GARCÍA-ALONSO, M.; RIMBACH, G.; RIVAS-GONZALO, J. C.; PASCUAL-TERESA, S. Antioxidant and cellular activities of anthocyanins and their corresponding Vitisins A - Studies in platelets, monocytes, and human endothelial cells. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 52, p. 3357-3384, 2004.

GARDINER, G. E.; SULLIVAN, O.; KELLY, J.; AUTRY, M. A. E. ; FITZGERALD, G. F.; COLLINS, J. K.; ROSSI, R. P.; STANTONI, C. Comparative survival rates of human-derived probiotic *Lactobacillus paracasei* and *L. salivarius* strains during heat treatment and spray drying. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 66, n.6, p. 2605-2612, 2000.

GIBSON, G. R.; ROBERFROID, M. B. Dietary Modulation of the human colonic microbiota: introducing the concept of prebiotics. **The Journal of Nutrition**, v. 125, p. 1401-1412, 1995.

GIBSON, G. R. Dietary modulation of human gut microflora using prebiotics. **British Journal of Nutrition**, v. 80, s.2, p. S209-S212, 1998.

GIBSON, G. R. Prebiotics. **Best Practice & Research Clinical Gastroenterology**, v.18, n. 2, p. 287-298, 2004/a.

GIBSON, G. R.; Fibre and effects on probiotics (The prebiotic concept). **Clinical Nutritional Supplements**, v.1, p. 25-31, 2004/b.

GIBSON, G. R. Prebiotics as Gut Microflora Management Tools. **Journal of Clinical Gastroenterology**, v. 42, s. 2, p. S75-S79, 2008.

GIBSON, G. R.; SCOTT, K. P.; RASTALL, R. A.; TUOHY, K. M.; HOTCHKISS, A.; DUBERT-FERRANDON, A.; GAREAU, M.; MURPHY, E. F.; SAULNIER, D.; LOH, G.; MACFARLANE, S.; DELZENNE, N.; RINGEL, Y.; KOZIANOWSKI, G.; DICKMANN, R.; LENOIR-WIJNKOOP, I.; WALKER, C.; BUDDINGTON, R.. Dietary prebiotics: current status and new definition. **Food Science and Technology Bulletin: Functional Foods**, v. 7, n.1, p. 1-19, 2010.

GOLOWCZYC, M. A.; SILVA, J.; TEIXEIRA, P.; DE ANTONI, G. I.; ABRAHAM, A. G. Cellular injuries of spray-dried *Lactobacillus* spp. Isolated from kefir and their impact on probiotic properties. **International Journal of Food Microbiology**, v. 144, p. 556-560, 2011.

GONÇALVES, A. E. de S. S. Avaliação da capacidade antioxidante de frutas e polpas de frutas nativas e determinação dos teores de flavonoides e vitamina C. Dissertação mestrado, Programa de Pós Graduação em Ciência de Alimentos, 88 p., 2008.

GOULA, A. M.; ADAMOPOULOS, K. G.; KAZAKIS, N. A. Influence of spray drying conditions on tomato powder properties. **Drying Technology**, v. 22, n. 5, p. 1129-1151, 2004.

GUARNER, F.; MALAGELADA, J. R. Gut flora in health and disease. **Lancet**, v. 361, p. 512-519, 2003

GUERGOLETTTO, K. B.; MAGNANI, M.; MARTIN, J. S.; ANDRADE, C. G. T. de J.; GARCIA, S. Survival of *Lactobacillus casei* (LC-1) adhered to prebiotic vegetal fibers. **Innovative Food Science and Emerging Technologies**, v. 11, p. 415-4212, 2010.

GUERGOLETTTO, K. B.; SIVIERI, K.; TSURUDA, A. Y.; MARTINS, E. P.; SOUZA, J. C. B.; ROIG M. S.; HIROOKA, E. Y.; GARCIA, S. Dried Probiotics for Use in Functional Food Applications. IN: **Food Industrial Processes - Methods and Equipment**, Benjamin Valdez (Ed.), InTech, 2012.

Available from: <http://www.intechopen.com/books/food-industrial-processes-methods-and-equipment/dried-probiotics-for-use-in-functional-food-applications>

GUIMARÃES, D. H. P.; MASCIGRANDE, D. D.; Polpas de Juçara e Açai: diferenças reológicas em função da temperatura e teor de sólidos suspensos. **Revista Brasileira de Tecnologia Aplicada nas Ciências Agrárias**, v. 4, n. 1, p. 169-181, 2011.

GRAY, J. Fibra Alimentar: Definição e análise, fisiologia e saúde. **ILSI Europe concise monograph series**, 52 p., 2006.

HIDALGO, M.; ORUNA-CONCHA, M. J.; KOLIDA, S.; WALTON, G, E.; KALLITHRAKA, S.; SPENCER, J. P. E.; GIBSON, G. R.; PASCUAL-TERESA, S. Metabolism of anthocyanins by human gut microflora and their influence on gut bacterial growth. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 60, p. 3882-3890, 2012.

HALLIWELL, B. How to characterize a biological antioxidant. **Free Radical Research Communications** v.9, p. 1-32, 1990.

HALLIWELL, B.; AESCHBACH, R.; LÖLIGER, J.; ARUOMA, O. I. The Characterization of antioxidants. **Food and Chemical Toxicology**, v.33, n. 7, p. 601-617, 1995.

HOWLETT, J. Alimentos funcionais: ciência, saúde e alegações. **ILSI Europe concise monograph series**. 2008.

HUEBNER, J.; WEHLING, R. L.; HUTKINS, R. W. Functional activity of commercial prebiotics. **International Dairy Journal**, v. 17, p. 770-775, 2007.

IGLESIAS, H. A.; CHIRIFE, J. **Handbook of food isotherms: water sorption parameters for food and food components**. Nova York: Academic Press Inc, 1982, 347 p.

ILLENSEER, R.; PAULILO, M. T. S. Crescimento e eficiência na utilização de nutrientes em plantas jovens de *Euterpe edulis* Mart. sob dois níveis de irradiância, nitrogênio e fósforo. **Acta Botanica Brasilica**, v. 16, n. 4, p. 69-77, 2002.

ISHWARYA, S. P.; ANANDHARAMAKRISHNAN, C.; STAPLEY, A. G. F. Spray-freeze-drying: A novel process for the drying of foods and bioproducts. **Trends in Fods Science & Technology**, v.41, p. 161-181, 2015.

ISOLAURI, E.; SALMINEN, S.; OUWEHAND, A. C. Probiotics. **Best Practice & Research Clinical Gastroenterology**, v. 10, n. 2, p. 299-213, 2004.

JANKOVIC, I.; SYSBEMA, W.; PHOTHIRATH, P.; ANANTA, E.; MERCENEIR, A. Application of probiotics in food products – Challenges and new approaches. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 21, p. 175-181, 2010.

JANTZEN, M.; GÖPEL, A.; BEERMANN, C. Direct spray drying and microencapsulation of probiotic *Lactobacillus reuteri* from slurry fermentation with whey. **Journal of Applied Microbiology**, v. 115, p. 1029-1036, 2015.

JENSEN, H.; GRIMMER, S.; NATERSTAD, K.; AXELSSON, L. In vitro testing of commercial and potential probiotic lactic acid bacteria. **International Journal of Food Microbiology**, v. 153, p. 216-222, 2012.

JONES, M. I.; MARTONI, C. J.; TAMBER, S.; PARENT, M.; PRAKASH, S. Evaluation of safety and tolerance of microencapsulated *Lactobacillus reuteri* NCIMB 30242 in a yogurt formulation: A randomized, placebo-controlled, double-blind study. **Food and Chemical Toxicology**, v. 50, p. 2216-2223, 2012.

JULIANO, P.; BARBOSA-CÁNOVAS, G. V. Food powders flowability characterization: theory, methods, and applications. **Annual Reviews of Food Science and Technology**, v. 1, p. 211-239, 2010.

KEARNEY, N.; MENG, X. C.; STANTON, C.; KELLY, J.; FITZGERALD, G. F.; ROSS, R. P. Development of a spray dried probiotic yoghurt containing *Lactobacillus paracasei* NFBC 338. **International Dairy Journal**, v. 19, p. 684-689, 2009.

KEMGANG, T. S.; KAPILA, S.; SHANMUGAM, V. P.; KAPILA, R. Cross-talk between probiotic lactobacilli and host immune system. **Journal of Applied Microbiology**, v. 117, n. 2, p. 303-319, 2014.

KESHANI, S.; DAUD, W. R. W.; NOUROUZI, M. M.; NAMVAR, F.; GHASEMI, M. Spray drying: An overview on wall deposition, process and modeling. **Journal of Food Engineering**, v. 146, p. 152-162, 2015.

KOPP-HOOLIHAN, L. Prophylactic and therapeutic uses of probiotics: a review. **Journal of the American Dietetic Association**, v. 101, p. 229-241, 2001.

LEE, J.; DURST, R. W.; WROLSTAD, R. E. Impact of juice processing on blueberry anthocyanins and polyphenolics: Comparison of two pretreatments. **Journal of Food Science**, v.67, n. 5, p. 1660-1667, 2002.

LEJA, M.; MARECZEK, A.; WYZGOLIK, G.; KLEPACZ-BANIAK, J.; CZEKONSKA, K. Antioxidative properties of bee pollen in selected plant species. **Food Chemistry**, v. 100, p. 237-240, 2007.

LESLIE, S. B.; ISRAELI, E., LIGHTHART, B.; CROWE, J. H.; CROWE, L. M. Trehalose and sucrose protect both membranes and proteins and intact bacteria during drying. **Applied Environmental Microbiology**, v. 61, p. 3592-3597, 1995.

LEY, R. E.; PETERSON, D.; GORDON, J. I. Ecological and evolutionary forces shaping microbial diversity in the human disease. **Cell**, v. 124, p. 837-848, 2006.

LIAN, W. C.; HSIAO, H. C.; CHOU, C. C. Survival of bifidobacteria after spray-drying. **International Journal of Food Microbiology**, v. 74, p. 79-86, 2002.

LIEVENSE, L. C.; VERBEEK, M. A. M.; NOOMEN, A., VAN'T RIET, K. Mechanism of dehydration inactivation of *Lactobacillus plantarum*. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 41, p. 90-94, 1994.

LINDERS, L. J. M.; JONG, de G. I. W.; MEERDINK, G.; RIET, K. V. Carbohydrates and the dehydration inactivation of *Lactobacillus plantarum* : The role of moisture distribution and water activity. **Journal of Food Engineering**, v. 31, p. 237-250, 1997.

LIONG, M. T.; SHAH, P. Acid and bile tolerance and cholesterol removal ability of lactobacilli strains. **Journal of Dairy Science**, v. 88, p. 55-66, 2005.

MACCAFERRI, S.; KLINDER, A.; CACCIATORE, S.; CHITARRARI, R.; HONDA, H.; LUCHINAT, C.; BERTINI, I.; CARNEVALL, P.; GIBSON, G. R.; BRIGIDI, P.; COSTABILE, A. In vitro fermentation of potential prebiotic flours from natural sources: impact on the human colonic microbiota and metabolome. **Molecular and Nutrition Food Research**, v. 56, p. 1342-1352, 2012.

MACFARLANE, S., MACFARLANE, G. T. Regulations of short-chain fatty acid production. **Proceedings of the Nutrition Society**, v. 62, p. 67-72, 2003.

MARCOS, C. S.; MATOS, D. M. S. Estrutura de populações de palmitreiro (*Euterpe edulis* Mart.) em áreas com diferentes graus de impactação na floresta da Tijuca, RJ. **Floresta e ambiente**, v. 10, n. 1, p. 27-37, 2003.

MATTILA-SANDHOLM, T.; MYLLARINEN, P.; CRITTENDEN, R.; MOGENSEN, G.; FONDEN, R.; SAARELA, M. Technological challenges for future probiotic foods. **International Dairy Journal**, v. 12, p. 173-183, 2002.

MENG, X. C.; STANTON, G. F.; FITZGERALD, C. D.; ROSS, R. P. Anhydrobiotics: The challenges of drying probiotic cultures. **Food Chemistry**, v. 106, p. 1406-1416, 2007.

MESTRY, A. P.; MUJUMDAR, A. S.; THORAT, B. N. Optimization of spray drying of an innovative functional food: fermented mixed juice of carrot and watermelon. **Drying Technology**, v. 29, p. 1121-1131, 2011.

MEYERS, D. Probiotic. **Journal of Exotic Pet Medicine**, v. 16, n. 3, p. 195-197, 2007.

MYLLYLUOMA, E.; VEIJOLA, L.; AHLROOS, T.; TYNKKYNNEN, S.; KANKURI, E.; VAPAATALO, H.; RAUTELIN, H.; KORPELA, R. Probiotic supplementation improves tolerance to *Helicobacter pylori* eradication therapy – a placebo – controlled, double-blind randomized pilot study. **Alimentary Pharmacology & Therapeutics**, v. 21, n. 10, p. 1263-1272, 2005.

MOUNTZOURIS, K. C.; McCARTNEY, A. L.; GIBSON, G. R. Intestinal microflora of human infants and current trends for its nutrition modulation. **British Journal of Nutrition**, v. 87, p. 405-420, 2002.

MUSSATTO, S. I.; MANCILHA, I. M. Non-digestible oligosaccharides: A review. **Carbohydrate Polymers**, v. 68, p. 587-597, 2007.

NADEEN, H. S.; TORUN, M.; OZDEMIR, F. Spray drying of the mountain tea (*Sideritis stricta*) water extract by using different hydrocolloid carriers. **LWT – Food Science and Technology**, v. 44, p. 1626-1635, 2011.

NEILL, S. O.; GOULD, K. S.; KILMARTIN, P. A.; MITCHELL, K. A.; MARKHAM, K. R. Antioxidant activities of red versus green leaves in *Elatostema rugosum*. **Plant Cell and Environment**, v. 25, p. 539-47, 2002.

OHASHI, Y.; USHIDA, K. Health-beneficial effects of probiotics: Its mode of action. **Animal Science Journal**, v. 80, p. 361-371, 2009.

OUWEHAND, A. C.; SVENDSEN, L. S.; LEYER, G. Probiotics: from Strain to Products. In KNEIFEL, Wolfgang, SALMINEN, Seppo. **Probiotics and Health Claims**. Wiley-Blackell, 2011, p. 37-48.

PARK, K. J.; ANTONIO, G. C.; OLIVEIRA De, R. A.; PARK, K. J. B. **Conceitos de processo e equipamentos de secagem**. Campinas, março, 2007.
Disponível em: http://www.feagri.unicamp.br/ctea/manuais/concproceqsec_07.pdf
Acesso em 12/06/2015.

PEIGHAMBARDOUST, S. H.; GOLSHAN, T. A. E.; HESARI, J. Application of spray drying for preservation of lactic acid starter cultures: a review. **Trends in Food Science & Technology**, v. 22, p. 215-224, 2011.

PERES, C. M.; PERES, C.; HERNANDEZ-MENDOZA, A.; MALCATA, F. X. Review on fermented plant materials as carriers and sources of potentially probiotic lactic acid bacteria with an emphasis on table olives. **Trends in Food Science & Technology**, v. 26, n. 1, p. 31-42, 2012.

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

PEREIRA, A. L. F.; ALMEIDA, F. D. L.; LIMA, M. A.; COSTA, J. M. C.; RODRIGUES, S. Spray-drying of probiotic cashew apple juice. **Food Bioprocess Technology**, v. 7, p. 2492-2499, 2014.

PRIOR, R. L.; WU, X.; SCHAICH, K. Standardized methods for the determination of antioxidant capacity and phenolics in foods and dietary supplements. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 53, p. 4290-4302, 2005.

QUEK, S. Y.; CHOK, N. K.; SWEDLUND, P. The physicochemical properties of spray-dried watermelon powders. **Chemical Engineering and Processing**, v. 46, p. 386-392, 2007.

QIN, Y.; JIN, XIAO-NAN; DONG, P. H. Comparison of antioxidant activities in black soybean preparations fermented with various microorganisms. **Agricultural Sciences in China**, 1065-1071, 2010.

RAFTER, J. Probiotics and colon cancer. **Best Practice and Research Clinical Gastroenterology**, v. 1, p. 849-859, 2003.

RAJABI, H.; GHORBANI, M.; JAFARI, S. M. MAHOONAK, A. S.; RAJABZADEH, G. Retention of saffron bioactive components by spray drying encapsulation using maltodextrin, gum Arabic and gelatin as wall materials. **Food Hydrocolloids**, v. 51, p. 327-337, 2015.

RAMALHO, V. C; JORGE, N. Antioxidantes Utilizados em Óleos, Gorduras e alimentos Gordurosos. **Revista Química Nova**, v. 24, p. 755-760, 2006.

RICE-EVANS, C. A.; MILLER, N. J.; PAGANÇA, G. Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids. **Free Radical Biology & Medicine**, v. 20, n. 7, p. 933-956, 1996.

RIVERA-ESPINOZA, Y.; GALLARDO-NAVARRO, Y. Non-dairy probiotic products. **Food Microbiolog**, v. 27, p. 1-11, 2010.

ROBERFROID, M.; GIBSON, G. R.; HOYLES, L.; McCARTNEY, A. L.; RASTALL, R.; ROWLAND, I.; WOLVERS, D.; WATZL, B.; SZAJEWSKA, H.; STAHL. B.; GUARNER, F.; RESPONDEK, F.; WHELAN, K.; COXAM, V.; DAVICCO, M. J.; LEOTOLNG, L.; WITTRANT, Y.; DELZENNE, N. M.; CANI, P. D.; NEYRINCK, A. M.; MEHEUST, A. Prebiotic effects: metabolic and health benefits. **British Journal of Nutrition**, v. 104, s.2, 2010.

ROCKLAND, L. B.; STEWART, G. F. **Water activity: influences on food quality.** New York: Academic Press Inc, 1981, 921 p.

ROGINSKY, V.; LISSI, E. A. Review of methods to determine chain-breaking antioxidant activity in food. **Food Chemistry**, v. 92, p. 235-254, 2005.

ROOS, Y. H. Glass transition temperature and its relevance in food processing. **Annual Reviews of Food Science and Technology**, v. 1, p. 469-496, 2010.

ROLFE, R. D. The role of probiotic cultures in the control of gastrointestinal health. **Journal of Nutrition**, v. 130, n. 2, p. 396-402, 2000.

RUSSEL, W. R.; HOYLES, L.; FLINT, H. J.; DUMAS, M. Colonic bacterial metabolites and human health. **Current Opinion in Microbiology**, v. 16, p. 246-254, 2013.

SANTIVARANGKNA, C.; KULOZIK, U.; FOERST, P. Effect of carbohydrates on the survival of *Lactobacillus helveticus* during vacuum drying. **Letters in Applied Microbiology**, v. 42, p. 271-276, 2006.

SANTIVARANGKNA, C.; KULOZIK, U.; FOERST, P. Inactivation mechanisms of lactic acid starter cultures preserved by drying process. **Journal of Applied Microbiology**, v. 105, p. 1-13, 2008.

SANTIVARANGKNA, C.; HIGL, B.; FOERST, P. Protection mechanisms of sugars during different stages of preparation process of dried lactic acid starter cultures. **Food Microbiology**, v. 25, p. 429-441, 2008.

SAKATANI, A.; FUJIYA, M.; KONISHI, H.; SEGAWA, S.; KASHIMA, S.; UENO, N.; TANAKA, K.; DOKOSHI, T.; ANDO, K.; KAWAMOTO, T.; GOTO, T.; TOMINAGA, M.; INABA, Y.; ITO, T.; MORIICHI, K.; TANABE, H.; KOHGO, Y. Probiotic-derived polyphosphate inhibits colon cancer progression through the inactivation of the ERK pathway and the induction of cancer cell apoptosis. **Gastroenterology**, v. 144, Suppl 1, pp. s873-, 2013.

SILVA, J.; CARVALHO, A. S.; FERREIRA, R.; VITORINO, R.; AMADO, F.; DOMINGUES, P.; TEIXEIRA, P.; GIBBS, P. A. Effect of the pH of growth on the survival of *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* to stress conditions during spray drying. **Journal of Applied Microbiology**, v. 98, p. 775-782, 2005.

SHAH, N. P. Functional foods from probiotics and prebiotics. **Food Technology**, v.55, p. 46-53, 2001.

SHAH, N. P. Functional cultures and health benefits. **International Dairy Journal**, v. 17, p. 1262-1277, 2007.

SHEEHAN, V. M.; ROSS, P.; FITZGERALD, G. F. Assessing the acid tolerance and the technological robustness of probiotic cultures for fortification I fruit juices. **Innovative Food Science and Emerging Technologies**, v. 8, p. 279-284, 2007.

SILVA, M. G. P. C.; BARRETTO, W. S.; SERÔDIO, M. H. Comparação nutricional da polpa dos frutos de juçara e de açaí. In: XVIII CONGRESSO BRASILEIRO DE FRUTICULTURA. Florianópolis, Santa Catarina, 22 a 26 de novembro de 2004..Anais...CD ROOM, Florianópolis, SC, 2004.
Disponível em 12/06/2012.

SOCCOL, C. R.; VANDENBERGHE, L. P. de S.; SPIER, M. R.; MEDEIROS, A. B. P.; YAMAGUSHI, C. T.; LINDNER, J. de D.; PANDEY, A.; SOCCOL, V. T. The potential of probiotics. **Food Technology Biotechnology**, v. 48, n. 4, p. 413-434, 2010.

STRINGHETA, P. C.; VILELA, M. A. P.; OLIVEIRA, T. T.; NAGEM, T. J. **Alimentos “Funcionais”**: Conceitos, contextualização e regulamentação. Ed. Templo: Juiz de Fora, 246 p., 2007.

SUGAWARA, T.; TAKAHASHI, S.; OSUMI, M.; OHNO, N. Refinement of the structures of cell-wall glucans of *Schizosaccharomyces pombe* by chemical modification and NMR spectroscopy. **Carbohydrate Research**, v. 339, p. 2255-2265, 2004.

TABART, J.; FRANCK, T.; KEVERS, C.; PINCEMAIL, J.; SERTEYN, D.; DEFRAIGNE, J. O.; DOMMES, J. Antioxidant and anti-inflammatory activities of *Ribes nigrum* extracts. **Food Chemistry**, v. 131, p. 1116-1122, 2012.

TAN, L. W.; IBRAHIM, M. N.; KAMIL, R.; TAIP, F. S. Empirical modeling for spray drying process of stick and non-stick products. **Procedia Food Science** 1, The 11th International Congress on Engineering and Food, p. 690-697, 2011.

TEIXEIRA, P.; CASTRO, H.; MOHÁCSI-FARKAS, C.; KIRBY, R. Identification of sites of injury in *Lactobacillus bulgaricus* during heat stress. **Journal of Applied Microbiology**, v. 83, p. 219-226, 1997.

TONON, R. V.; BRABET, C.; HUBINGER, M. D. Influence of process conditions on the physicochemical properties of açaí (*Euterpe oleraceae* Mart.) powder produced by spray drying. **Journal of Food Engineering**, v. 88, p. 411-418, 2008.

TONON, R. V.; BARONI, A. F.; BRABET, C.; GILBERT, O.; PALLET, D.; HUBINGER, M. D. Water sorption and glass transition temperature of spray dried açaí (*Euterpe oleracea* Mart.) juice. **Journal of Food Engineering**, v. 94, p. 904-914, 2009.

TOLHURST, G.; HEFFRON, H.; LAM, Y. S.; PARKER, H. E.; HABIB, A. M.; DJAKOGIANNAKI, E.; CAMERON, J.; GROSSE, J.; REIMANN, F.; GRIBBLE, F. M. Short-Chain Fatty Acids Stimulate Glucagon-Like Peptide-1 Secretion via the G-Protein-Coupled Receptor FFAR2. **Diabetes**, v. 61, p. 364–71, 2012.

YEO, S. K.; EWE, J. A.; THAM, C. S. C.; LIONG, M. T. Carriers of Probiotic Microorganisms. In: LIONG, Min-Tze. **Probiotics: Biology, Genetics and Health Aspects**. Malasia: Springer, 2011. p. 191-215.

YOON, K. Y.; WOODAMS, E. E.; HANG, Y. D. Probiotication of tomato juice by lactic acid bacteria. **Journal of Microbiology**, v. 42, n. 4, p. 315-318, 2004.

YOON, K. Y.; WOODAMS, E. E.; HANG, Y. D. Fermentation of beet juice by beneficial lactic acid bacteria, v. 38, p. 73-75, 2005.

VASILJEVIC, T.; SHAH, N. P. Probiotics – From Metchnikoff to bioactives. **International Dairy Journal**, v. 18, n. 7, p. 714-728, 2008.

VESCOVO, M.; TORRIANI, S.; DELLAGLIO, F.; BOTTAZZI, V. Basic characteristics, ecology and application of *Lactobacillus plantarum*: a review. **Annual Microbiology and Enzymology** v. 43, p. 261-284, 1993.

VULEVIC, J.; JURIC, A.; TZORTZIS, G.; GIBSON, G. R. A mixture of trans-galactooligosaccharides reduces marker of metabolic syndrome and modulates the fecal microbiota and immune function of overweight adults. **The Journal of Nutrition**, v. 143, n. 3, 324-331.

WANG, Y. C.; YU, R. C.; CHOU, C. C. Viability of lactic acid bacteria and bifidobacteria in fermented soymilk after drying, subsequent rehydration and storage. **International Journal of Food Microbiology**, v. 93, p. 209-217, 2004.

WANG, S.; CHEN, C. T.; SCIARAPPA, W.; WANG, C. Y.; CAMP, M. J. Fruit quality, antioxidant capacity, and flavonoid content of organically and conventionally grown blueberries. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 56, p. 5788, 5794, 2008.

WANG, B.; LI, J.; LI, Q.; ZHANG, H.; LI, N. Isolation of adhesive strains and evaluation of the colonization and immune response by *Lactobacillus plantarum* L2 in the rat gastrointestinal tract. **International Journal of Food Microbiology**, v. 132, p. 59-66, 2009.

WALKER, W. A. Mechanisms of action of probiotics. **Clinical Infectious Disease**, v. 46, p. S87-S91, 2008.

WIELE, T. V.; BOON, N.; POSSEMIERS, S.; JACOBS, H.; VERSTRAETE, W. Prebiotic effects of chicory inulin in the simulator of the human intestinal microbial ecosystem. **FEMS Microbiology Ecology**, v. 51, p. 143-153, 2004.

WOOD, L. G.; GIBSON, P. G.; GARG, M. L. A review of the methodology for assessing in vivo antioxidant capacity. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 86, p. 2057-2066, 2006.

ZOETENDAL, E. G.; RAJILIC-STOJANOVIC, M.; VOS, W. M. High-throughput diversity and functionality analysis of the gastrointestinal tract microbiota. **Gut**, v. 57, n. 11, p. 1605-1615, 2008.

CAPÍTULO II – *IN VITRO* FERMENTATION OF JUÇARA PULP (*EUTERPE EDULIS*) BY HUMAN COLONIC MICROBIOTA¹

ABSTRACT

This study was carried out to investigate the potential fermentation properties of juçara pulp using pH-controlled anaerobic batch cultures reflective of the distal region of the human large intestine. Effects upon major groups of the microbiota were monitored over 24 h incubations by fluorescence *in situ* hybridisation (FISH). Short-chain fatty acids (SCFA) were measured by HPLC. Phenolic compounds during an *in vitro* simulated digestion and fermentation were also analysed. Juçara pulp can modulate the intestinal microbiota *in vitro*, promoting changes in the relevant microbial populations and shifts in the production of SCFA. Fermentation of juçara pulp resulted in a significant increase in numbers of bifidobacteria after 24h fermentation compared to a negative control. After *in vitro* digestion, 46 % of total phenolic content were still remaining. This is a first study reporting the potential prebiotic effect of juçara pulp, however human studies are necessary to prove its efficacy.

Keywords: Jussara; batch culture fermentation system; faecal microbiota; phenolic compounds, *Bifidobacteria*.

¹ Situação: Publicado na *Food Chemistry*, v.196, p. 251-258, 2016.

Karla Bigetti Guergoletto^{a,b*}; Adele Costabile^{a,d}; Gema Flores^c; Sandra Garcia^b; Glenn R. Gibson^a

^aDepartment of Food and Nutrition Sciences. The University of Reading RG6 6AP, Reading, UK

^bPermanent adress: Department of Food Science and Technology; State University of Londrina, Celso Garcia Cid Road, Km 380; C.P.:6001; 86051-970; Londrina, Brazil

^cConsejo Superior de Investigaciones Científicas – CSIC, Madrid, Spain.

^dHealth Sciences Research Centre, Life Sciences Department, Whitelands College, University of Roehampton, London, United Kingdom

2.1 INTRODUCTION

Juçara (*Euterpe edulis*) is a palm tree that belongs to Arecaceae family and the genus *Euterpe*, widely distributed to the Atlantic forest. This plant produces a noble type of palm heart, with higher quality and superior flavour, compared to other *Euterpe* species, which are widely consumed and has economic importance in Brazil (Borges et al., 2011). Besides the palm heart, juçara also produces a round fruit with a glossy black pulp covering the seed. It has varied harvest and production period depending on geographic and climatic origins (De Brito, De Araujo, Alves, Carkeet, Clevidence, Noyotny, 2007).

To be consumed, juçara berries are usually macerated with water and separated from their seeds to obtain a thick and purple pulp, which is consumed as such or further used in different kinds of beverage, ice creams, sweets and sauces (Borges et al., 2011). The juçara pulp has an important nutritional value, with proteins, sugars, fibre and a lipid fraction with high content of polyunsaturated fatty acids like oleic acid and a lower content of saturated lipids. Besides, juçara is rich in phenolic compounds, with a content of total monomeric anthocyanins varying from 14.84 to 409.85 mg cy-3 glu.100/g and total phenolic around 2610.86 mg 100/g GAE according to the growth region and climate conditions of plant production (Borges et al., 2011).

High levels of phenolic compounds with antioxidant activity present in fruits, especially berries, has been often associated with reduced risk of several chronic diseases caused by oxidative stress (Manach, Scalbert, Remesy, Jiménez, 2004). Different studies have been demonstrated that the *in vivo* effect of phenolic compounds is also dependent on absorption and metabolism in the gastrointestinal tract. It has been estimated that only 5-10% of the total polyphenol intake is absorbed in the small intestine. The remaining polyphenols (90-95% of total polyphenol intake) may accumulate in the large intestinal lumen up to the millimolar range where the colonic microbiota are responsible for breakdown of the original polyphenolic structures into a series of low-molecular-weight metabolites that, being absorbable, may actually be responsible for health effects derived from polyphenol rich food consumption, rather than the original compounds found in foods (Cardona, Andres-Lacuerva, Tulipania, Tinahonesb, Queipo-Ortuno, 2013).

The human large intestine is an extremely active fermentation site and is inhabited by over 1000 different bacterial species, which reach numbers around 10^{14} colony-forming units in total (Gibson, Roberfroid, 1995). Through the process of fermentation, gut microbiota is able to produce a wide range of compounds that have both positive and negative effects on gut physiology as well as systemic influences. The balance among these bacterial species has been linked to both beneficial and detrimental effects in the large intestine. *Bifidobacterium* spp. and *Lactobacillus* spp. are genera that have been shown to exert beneficial effects in the colon, whilst others, have been associated with deleterious bacterial species such as certain members of the *Clostridium* group (Rastall et al., 2005).

Diet is considered a major driver for changes in the functional relationship between microbiota and the host. At present, non-digestible food ingredients represent a useful dietary approach for influencing composition of the human gut microbiota and/or activity of the gastrointestinal microbiota, thus conferring benefits upon host health (Maccaferri et al., 2012). Previous *in vitro* studies have been used to better understand the influence of phenolic compounds on the bacterial metabolism although much work has been conducted on the isolated effect of these compounds on the composition and activity of the human gut microbiota (Keppler, Humpf, 2005; Hidalgo et al., 2012; Cueva et al., 2013). Recently, few studies have focused on the impact of whole plant foods on gut microbial species composition and relative abundance (Carvalho-Wells et al., 2010; Tuohy et al., 2012).

This study aimed to investigate the potential of juçara pulp to influence the growth of specific bacterial groups in a pH-controlled, stirred, batch-culture fermentation system that is reflective of the environmental conditions of the distal region of the human large intestine. We also investigated the metabolism of anthocyanins and phenolics compounds in the juçara pulp during an *in vitro* simulated digestion and fermentation by the gut microbiota.

2.2 MATERIALS AND METHODS

2.2.1 Juçara Pulp

Juçara grains were collected during the 2014 harvest from *Euterpe edulis* palm trees produced at the Bimini Farm (Rolândia, Paraná, Brazil). To obtain the

pulp, the fruits were washed with clean water and sanitised for 30 min in water containing chlorine at a concentration of 200 mg/kg. Then, the grains were rinsed and pulped with clean water (1:1) using a depulper (Macanuda DM-Ji-05, Brazil). The seeds were separated for planting and the extract pasteurised in a water bath at 80 °C for 1 min, followed by cooling in an ice bath, and lyophilised. This extraction followed the methodology used to produce açai and juçara pulp in industrial demands (Cohen, Alves, 2006). Lyophilised juçara pulp nutritional profile was characterized by official reference methods (ashes: UNI ISO 2171; proteins: UNI 10274 831/12/93 and ISO 1871 (15/12/75); total dietary fibre: AOAC 985.29; RS: AOAC 2002.02; glucans: AOAC 995.16 2005).

2.2.2 Simulated In Vitro Human Digestion

Prior to being added into the batch culture systems, the lyophilised juçara pulp were digested in *vitro* under appropriate conditions according to the procedures describes by Maccaferri et al. (2012) Sixty grams of pulp was mixed with 150 mL of sterile distilled water and homogenized in a stomacher (Seward, Worthing, U.K), at high speed for 5 min. α -amylase (20 mg) was mixed with 1 mM CaCl_2 (6.25 mL, pH 7.0) and added to the juçara solution, then incubated at 37 °C in an incubator room for 30 min, under shaking at 150 rpm. After incubation, pH was adjusted to 2.0 and pepsin (2.7 g) in 0.1 M HCl (25 mL) was added, prior to a further incubation cycle, under shaking conditions, at 37 °C for 2 h. Finally, bile (3.5 g) and pancreatin (560 mg) were mixed with 0.5 M NaHCO_3 (125 mL), the pH was adjusted to 7.0, and the mixture were incubated at 37 °C for 3 h. After this period, the samples solution was transferred to 1 kDa molecular weight cut-off regenerated cellulose dialysis tubing (Spectra/Por® 6, Spectrum Europe, Netherlands) and dialysed against NaCl (0.01 mol/L at 5 °C) to remove monosaccharides from the pre-digested juçara. After 15 h, the dialysis fluid changed and the process continued for an additional 2 h. Afterwards, the samples were lyophilised until the samples were completed dried (~7 days).

After each step of the digestion, 5 mL samples were collected and lyophilised for anthocyanins and phenolic compounds analysis by HPLC.

2.2.3 Faecal Sample Preparation

Faecal samples were collected from three separate individuals. All donors were in good health and had not had antibiotics for at least 6 months before the study. Samples were collected, on site, on the day of the experiment and placed in an anaerobic jar (Anaerojar™ 2.5L, Oxoid Ltd) including a gas-generating kit (AnaeroGen™, Oxoid) in order to reproduce the anaerobic conditions, for no longer than 1 h. Then, samples were weighted and diluted 1:10 (w/v) with anaerobic sterile phosphate buffered saline (0.1 M; pH 7.4) and homogenised in a stomacher for 2 min (460 paddle/min). To keep the anaerobic conditions, the phosphate buffered saline was maintained in anaerobic cabins until the time of use. Resulting faecal slurries from each individual were used to inoculate the batch-culture systems.

2.2.4 Batch Culture Fermentation

Batch-culture fermentation vessels (working volume 100 mL) were sterilised and filled with 45 mL of basal nutrient medium (peptone water (2 g/L), yeast extract (2 g/L), NaCl (0.1 g/L), K₂HPO₄ (0.04 g/L), NaCO₃ (2 g/L), MgSO₄·7H₂O (0.01 g/L), CaCl₂·6H₂O (0.01 g/L), Tween 80 (2 mL/L), haemin (50 mg/L), vitamin K1 (10 µL/L), L-cysteine (0.5 g/L), bile salts (0.5 g/L), resazurin (1 mg/L) and distilled water). The pH of basal medium was adjusted to 7 and autoclaved before dispensing into vessels. Medium was then gassed overnight with O₂-free N₂ (15 mL/min) to keep the anaerobic condition. Before addition of faecal slurries, temperature of the basal nutrient medium was set to 37 °C using a circulating water bath and the pH was maintained at 6.8 using a pH controller (Electrolab, U.K.). The vessels were inoculated with 5 mL of faecal slurry (1:10, w/v), and in order to mimic conditions located in the distal region of the human large intestine the experiment was ran under anaerobic conditions [the system was permanently gassed with O₂-free N₂ (15 mL/min)], 37 °C and pH 6.8 for a period of 24 h. During this period, samples (4 mL) were collected at four time points (0, 4, 8 and 24 h) for fluorescence *in situ* hybridization (FISH) and SCFAs and at seven time points (0, 1, 2, 4, 6, 8, 24 h) for phenolic compounds by HPLC. Before FISH analysis, duplicate samples were fixed for a minimum of 4 h at 4 °C with 4 % (w/v) filtered paraformaldehyde at 4 % (w/v). For HPLC analysis, samples were centrifuged for 10 min at 1300 g and fermentation

supernatant fractions were removed and stored in sterile Eppendorff tubes (1.5 mL) at -20 °C until analysis.

2.2.5 Inoculation of Juçara Pulp in the Batch Culture Fermentation Systems

The lyophilised digested juçara pulp (1 % w/v) was inoculated in stirring batch-culture vessels (one vessel per donor) containing faecal slurry (1 %). The prebiotic FOS (1 % w/v) (Raftilose P95 – Orafti, Tienen, Belgium) and basal nutrient media with no substrate added (negative control), were also included in the experiment as positive and negative controls, respectively.

2.2.6 *In Vitro* Enumeration of Bacterial Population by FISH

FISH was performed as described by Daims, Stolcker, Wagner, (2005). Briefly, aliquots (375 µl) of batch culture supernatant samples were fixed in 1.125 µL of 4 % (w/v) filtered paraformaldehyde, then centrifuged at 13000 g for 5 min and washed twice with 1 mL of sterile PBS (0.1 M; pH 7.0). The cell pellet was resuspended in 300 µL of PBS-99 % ethanol mixture (1:1, v/v), and stored at -20 °C until used for hybridization. Oligonucleotides probes designed to target specific regions of 16S rRNA were commercially synthesized and labelled with the fluorescent dye Cy3 (Sigma-Aldrich, UK). Bacterial groups enumerated were Eub I-II-III for the total number of bacteria (Daims, Bruh, Amann, Schleifer, Wagner, 1999); Bif164 specific for *Bifidobacterium* spp. (Langendijk et al. 1995); Lab158 for *Lactobacillus-Enterococcus* spp. (Harmsen, Elfferich, Schut, Welling, 1999); Bac303 specific for the *Bacteroides-Prevotella* group (Manz, Amann, Ludwig, Vancanneyt, Schleifer, 1996); Chis150 for the *Clostridium histolyticum* subgroup; Erec482 for most members of *Clostridium cluster XIVa* (Franks, Harmsen, Raangs, Jonsen, Schut, Welling, 1998) and Prop853 for *Clostridium cluster IX* (Walker, Duncan, McWilliam Leitch, Child, Flint, 2005).

2.2.7 High-Performance Liquid Chromatography Analysis

Samples were taken from the batch culture vessels at each time point and cell-free culture supernatants obtained by centrifugation of 1 mL at 13,000 g for 10

min followed by filter sterilisation (0.22 µm; Millipore, Cork, Ireland) to remove particulate matter. SCFA content was quantified by ion exclusion high performance liquid chromatography (HPLC) (LaChrom Merck Hitachi, Poole, Dorset UK) equipped with pump (L-7100), RI detector (L-7490) and autosampler (L-7200). Samples (20 µL) were injected into the HPLC, operating at a flow rate of 0.5 mL/min with column prepacked Rezex ROA – Organic Acid H+ 80 % (300 x 7.8 mm) at a temperature of 84 °C and wavelength of 210 nm. H₂SO₄ (2.5 mM) was used as eluent and the organic acids: formic, lactic, acetic, propionic and butyric, were calibrated against standards at concentrations of 12.5, 25, 50, 75 and 100 mM. Internal standard of 2-ethylbutyric acid (20 mM) was included in the samples and external standards. All chemicals were provided from Sigma-Aldrich (Poole, Dorset, UK).

Analysis of anthocyanins and other phenolic compounds were also evaluated in the lyophilised juçara extract before, during and after digestion, and in the batch-culture vessels, using an Agilent 1100 series liquid chromatograph equipped with a quaternary pump and a photodiode array detector (Hewlett–Packard Agilent, Bracknell, UK). A Nova Pak C18 4-µm column (4.6 x 250 mm) and the mobile phases: A (95 % HPLC water, 5 % methanol and 1 % formic acid); mobile phase B (50 % HPLC water, 50 % acetonitrile and 1 % formic acid), at a flow rate of 0.7 mL/min were used in the experiment. Starting with 5% B, the gradient was as follows: from 5 % B to 50 % B in 40 min, from 50 % B to 100 % B in 10 min, isocratically 100 % B in 5 min and from 100 % B to 5 % B in 5 min. Detection wavelengths were 254, 280, 320, 365 and 520 nm. Peaks areas were referred to calibrations curves obtained with the corresponding standards for anthocyanin and other phenolic compounds. For lyophilised juçara extract, 0.4 g of each sample were previously extracted with 5 mL 1 % formic acid with methanol, vortex for 1 min and centrifuged at 13,000 g. Batch cultures samples were centrifuged (13,000 g / 10 min), and both supernatants were filtered through a 0.22 µm filter and autoinjected into HPLC system.

2.2.8 Total Phenolic Analysis

The total phenolic content were analyzed according to the Folin-Ciocalteu method adapted to 96-well plate microliter assay, using gallic acid as the standard. 5 µl of the diluted extracts or standards were mixed with 145 µL of distilled water and

25 µl of Folin-Ciocalteu reagent. After 3 min at room temperature, 100 µl of sodium carbonate saturated solution was added and the solution kept in a shaker for 25 min at room temperature. The absorbance of the samples were measured at 650 nm using a GENios pro microplater reader (Tecan, Theale, Berks, UK) equipped to a Magellan Software. Methanolic solutions of gallic acid (Sigma-Aldrich, Poole, Dorset, UK) with concentration of 0 to 500 mg/L were used for the calibration curve, and results were expressed as g gallic acid equivalents (GAE)/g or L of sample.

2.2.9 Statistical Analysis

Differences between bacterial counts and SCFA profiles at 0, 4, 8 and 24 h fermentation were tested for significance using paired t-tests assuming equal variance and considering a two-tailed distribution. To determine whether there were any significant differences in the effect of the substrates; differences at each time were tested using 2-way ANOVA with Bonferroni post-test ($P < 0.05$). Significant differences were defined at $P < 0.05$. All analyses were performed using GraphPad Prism 5.0 (GraphPad Software, LaJolla, CA, USA).

2.3. RESULTS

The juçara pulp nutritional profile was characterized and the results are demonstrated in Table 1.

Table 1. Composition and nutritional profile of the lyophilised juçara pulp used in the present study.

Analysis	Result
Energy*	403
Protein**	7.6
Total Carbohydrate (by difference)**	63.0
Carbohydrate**	28.8
Total sugars** ^a	3.8
Fat**	21.0
Fibre Total**	34.2
Sodium***	28
Moisture**	4.1
Ash**	4.31

* Results expressed as kcal/100g; ** Results expressed as g/100g; ***Results expressed as mg/100g
^aTotal sugars are the sum of glucose, sucrose and fructose expressed as monosaccharides

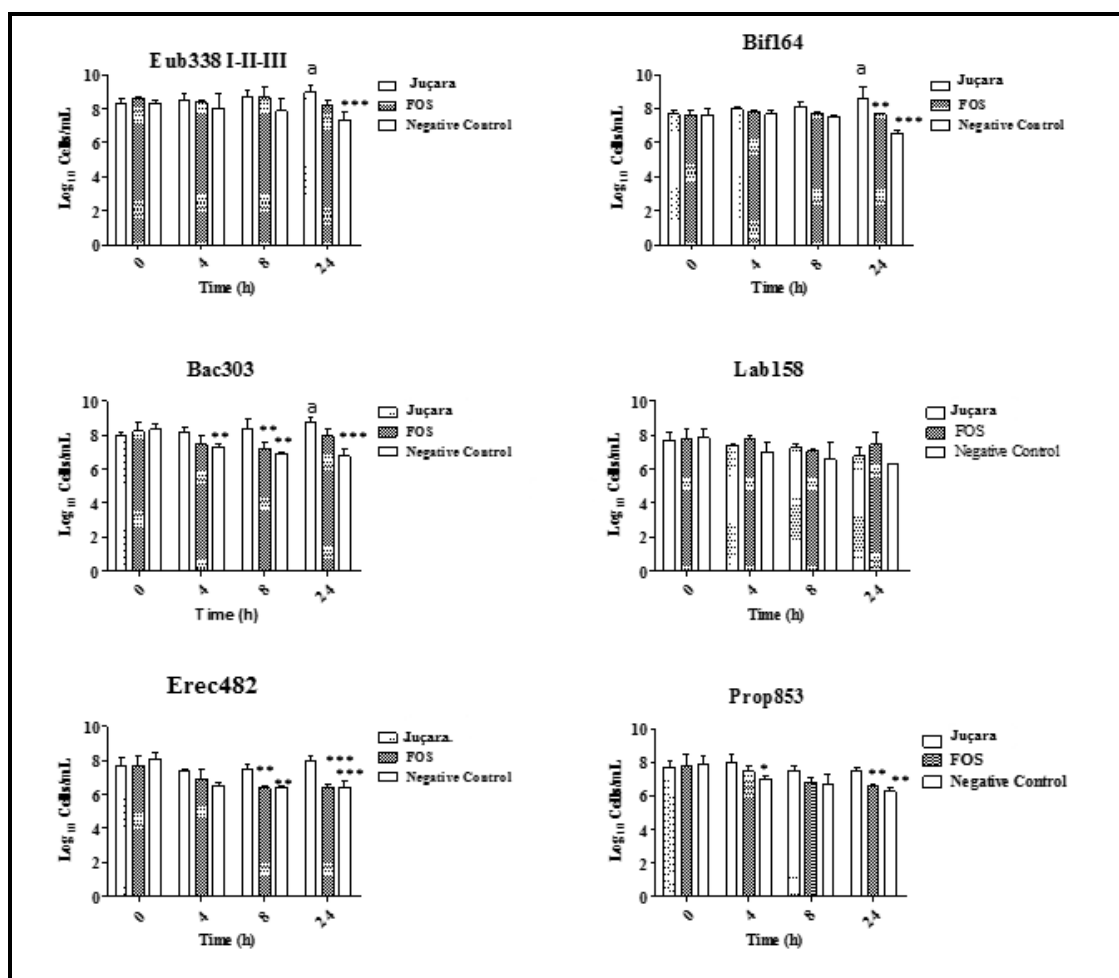
2.3.1 Changes in Bacterial Populations in In Vitro Batch Culture Fermentation

Numbers of the main bacterial groups constituting the core of the human intestinal microbiota were assessed by FISH during the experimental time course (0, 4, 8 and 24 h) (Figure 1). Following juçara pulp fermentation, numbers of the domain bacteria (detected by EUB I-II-III) were increased after 24 h ($P < 0.001$) of fermentation (8.32 ± 0.26 to 8.96 ± 0.39 Log CFU/ml). A significant increase in numbers of *Bifidobacterium* spp. (detected by Bif164 probe) was observed after 24 h fermentation (7.67 ± 0.17 to 8.5 ± 0.7 Log CFU/ml) compared to FOS-Raftilose 95 (7.61 ± 0.31 to 7.6 ± 0.09 Log CFU/ml) and the negative control (7.62 ± 0.31 to 6.5 ± 0.24 Log CFU/ml) ($P < 0.001$). Levels of *Bacteroides* spp.-*Prevotella* group (enumerated by Bac303) and *Eubacterium rectale*-*Clostridium coccooides* group (enumerated by Erec482) significantly increased at 4 h ($P < 0.05$), 8 h ($P < 0.01$) and 24 h ($P < 0.001$), whereas, no significant differences were detected for *Lactobacillus/Enterococcus* spp. (detected by Lab158) at all time points. Cluster IX representatives (detected by Prop853) were increased by juçara pulp after 24 h fermentation (7.50 ± 0.25 Log CFU/ml) compared to FOS-Raftilose 95 (6.59 ± 0.07 Log CFU/ml) ($P < 0.001$). Very low numbers of *Clostridium histolyticum* group (Chis 150) were detected for all samples at time 0 h (5.73 ± 0.12 Log CFU/ml). However, after 4 h of fermentation it was not possible to count any bacteria from this group, and a decrease below the limit detection could be occurred.

2.3.2 SCFA Production

Table 2 shows profiles of SCFA in the batch culture at 0, 4, 8 and 24 h of fermentation for juçara pulp, FOS-Raftilose 95 and negative control. At 24 h, fermentation of juçara pulp resulted in a higher production of acetate and propionate but lower amounts of butyrate. As expected, the juçara fermentation resulted in significantly higher amount of acetate and propionate compared to the negative control, however these amounts were lower for butyrate and similar for propionate and acetate when compared to the positive control (FOS) after 24 of fermentation.

Figure 1. Bacterial populations analysed by fluorescence in situ hybridisation (FISH) in a batch cultures fermentation containing juçara pulp, FOS and negative control at 0, 4, 8 and 24 h of fermentation. Results are reported as mean of the data (n = 3) Log₁₀ CFU/ml.



Significant differences from juçara (using 2-way ANOVA Bonferroni post-tests to compare replicate means) * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$. Significant differences for the same vessels compared to 0 h within the same substrate (using t-test, $P < 0.05$), are indicated with letters.

2.3.3 Changes in Phenolic Compounds of Juçara Pulp During Digestion and Fermentation by Human Faecal Bacteria

In order to follow up the degradation of juçara during digestion, main flavonoids compounds were monitored by HPLC as reported in Table 3. The mainly anthocyanins detected in juçara pulp were cyanidin-3-rutinoside followed by cyanidin-3-glucoside, malvidin-3-glucoside, peonidin-3-rutinoside and pelargonidin-3-glucoside, and the flavonoids rutin, quercetin and p-coumaric acid. At oral and gastric phases, just a small amount of anthocyanins were degraded, and after gastric phase, more than a half of its amount were still present. However, after the intestinal phase,

anthocyanins were reduced in abundance compared to the original sample and after dialysis malvidin, peonidin and pelargonidin were not detected. The detected flavonols quercetin and rutin were also degraded during the digestion in contrast with p-coumaric acid that slightly increased after dialysis.

Table 2. Concentrations of major short-chain fatty acid during 0, 4, 8 and 24 h fermentation with juçara, FOS and negative control in stirred pH controlled batch culture system. Values are means with standard deviations (n = 3).

Treatment	Time point	Mean SCFA concentration (mM) in treatment (\pm SD)		
		Juçara	FOS (+ control)	- Control
Acetic	0 h	3.37 \pm 0.35	2.51 \pm 0.40	3.87 \pm 0.2
	4 h	9.92 \pm 3.31 ^a	3.85 \pm 0.36	2.26 \pm 1.80*
	8 h	11.38 \pm 2.22 ^a	18.12 \pm 5.65 ^a	3.15 \pm 2.39*
	24 h	15.76 \pm 3.81 ^a	25.05 \pm 14.84 ^a	4.08 \pm 3.22*
Propionic	0 h	2.72 \pm 0.24	0.72 \pm 1.58 ^{***}	2.45 \pm 0.09
	4 h	12.92 \pm 0.74 ^a	1.86 \pm 2.63 ^{***}	2.59 \pm 2.15 ^{**}
	8 h	14.46 \pm 5.98 ^a	3.24 \pm 3.08*	2.63 \pm 2.01 ^{**}
	24 h	15.79 \pm 5.06 ^a	11.32 \pm 8.22 ^a	2.20 \pm 1.38 ^{**}
Butyric	0 h	1.16 \pm 0.18	0.22 \pm 0.08	1.19 \pm 0.02
	4 h	1.15 \pm 0.40	0.92 \pm 0.70	0.96 \pm 0.10
	8 h	0.9 \pm 0.48	3.20 \pm 3.74	0.90 \pm 0.44
	24 h	1.10 \pm 0.13	11.00 \pm 11.15 ^{*a}	0.57 \pm 0.35

*P < 0.05, ** P < 0.01, *** P < 0.001, significantly different from juçara at the same time point using two-way ANOVA with Bonferroni post test. Significant differences compared to 0 h within the same substrate (using t-test, P < 0.05), are indicated with letters.

Table 3. Content of anthocyanins and phenolic compounds detected by HPLC in lyophilised juçara pulp before, during and after simulated in vitro human digestion. Values are means with standard deviation (n = 3).

Compound	Juçara Pulp	Oral Phase	Gastric Phase	Intestinal Phase	After dialysis
Cyanidin-3-rutinoside	966.14 \pm 54.90	720.16 \pm 33.76	670.2 \pm 24.43	12.95 \pm 4.60	8.19 \pm 1.99
Cyanidin-3-glucoside	322.19 \pm 43.71	217.64 \pm 21.73	187.55 \pm 19.09	3.03 \pm 0.43	2.29 \pm 0.76
Malvidin-3-glucoside	33.23 \pm 6.78	14.73 \pm 3.50	15.09 \pm 5.60	2.58 \pm 0.09	N.D
Peonidin-3-rutinoside	16.17 \pm 1.12	9.24 \pm 1.67	9.37 \pm 0.87	1.15 \pm 0.41	N.D
Pelargonidin-3glucoside	15.6 \pm 3.32	3.12 \pm 0.56	2.73 \pm 0.07	N.D	N.D
Rutin	9.4 \pm 2.87	8.23 \pm 1.45	9.22 \pm 1.67	6.98 \pm 1.22	1.2 \pm 0.56
Quercetin	4.8 \pm 1.09	3.73 \pm 0.98	3.85 \pm 0.93	1.39 \pm 0.03	1.2 \pm 0.69
p-coumaric	6.96 \pm 2.02	6.56 \pm 1.06	8.26 \pm 0.76	10.2 \pm 0.84	8.39 \pm 1.34
Gallic acid	N.D	N.D	N.D	N.D	N.D
Syringic acid	N.D	N.D	N.D	N.D	N.D
Benzoic acid	N.D	N.D	N.D	N.D	N.D
Total phenolic*	3474.3 \pm 98.00	2205.4 \pm 59.31	2205.8 \pm 88.94	1672.8 \pm 42.9	1613.8 \pm 74.3

* Data presented as mg of gallic acid equivalent (GAE) / 100g
N.D = not detected

Despite anthocyanin degradation, 46% of total phenolics contents remained after juçara digestion, being an important source of antioxidant activity that could reach the colon.

In order to evaluate the metabolism of phenolic compounds of digested lyophilised juçara pulp by human faecal microbiota, samples were collected at 0, 1, 2, 4, 6, 8 and 24 h and analysed using HPLC and total phenolics analysis (Table 4). After 1 h of incubation, a small amount of benzoic acid started to appear followed by gallic and syringic acid. No significant differences were found for rutin, p-coumaric acid and the total amount of phenolics was kept constant during *in vitro* fermentation.

Table 4. Phenolic compounds metabolism detected by HPLC during juçara fermentation by human colonic microbiota in pH controlled batch culture system for 24 h. Values are means with standard deviation (n = 3).

Incubation time	Compounds						Total phenolic**
	Rutin*	Quercetin*	p-coumaric acid*	Gallic acid*	Syringic acid*	Benzoic acid*	
0 h	0.17±0.08	N.D	Tr	N.D	N.D	N.D	454.4±62.5
1 h	0.20±0.04	N.D	Tr	N.D	N.D	0.04±0.03	430.4±57.8
2 h	0.18±0.09	N.D	Tr	Tr	N.D	0.02±0.01	442.3±23.6
4 h	0.18±0.04	N.D	Tr	Tr	Tr	0.02±0.01	423.6±155.6
6 h	0.19±0.04	N.D	0.001±0.000	0.001±0.000	Tr	0.02±0.01	476.6±122.4
8 h	0.20±0.04	N.D	0.001±0.000	0.003±0.000	0.003±0.001	0.01±0.00	497.1±108
24 h	0.18±0.02	N.D	0.001±0.000	0.003±0.000	0.006±0.001	0.006±0.002	544.4±157.3

*Data presented as mg/mL

** Data presented as mg GAE/L

N.D = not detected; Tr = Traces

2.4. DISCUSSION

To date, scientific focus has been placed on the potential health benefits of açai (*Euterpe oleracea*) and juçara (*Euterpe edulis*) in terms of its antioxidant activity (Borges et al., 2011; Cunha Junior, Nardini, Khatiwada, Teixeira, Walsh, 2015). This is a first study that investigated the influence of juçara pulp fermentation on a complex faecal microbiota *in vitro*.

The prebiotic effects of fructooligosaccharides and galactooligosaccharides are thought to underpin certain functional outcomes in the large gut and there are evidences regarding the ability of other dietary components, including flavonoids, to influence the growth of selected intestinal bacteria (Tzounis et al., 2008). The human

colon contains a wide range of bacterial communities distributed in hundreds of distinct species and the balance among them, plays an important role in health and disease (Holzapfel, Haberer, Snel, Schillinger, Veld, 1998; Rigottier-Gois, Rochet, Garrec, Suaru, Dore, 2003).

Substrates that escaped from human digestion, can be used for the beneficial bacteria growth. After digestion, juçara pulp presented 3.2 g/100g of available sugar, 18.6 g/100g of fibre (data not shown) and 1613.8 mg GAE/100g of total phenolics that could be available for gut bacteria metabolism. Carbohydrate fermentation is the chief energy source for the gut microbiota, however, as colonic carbohydrate are used up in the proximal colon, saccharolytic fermentation decreases as the concentration of substrate decreases. Microorganisms then switch to other energy sources, like proteins, amino acids, among others and the end products of these fermentations include SCFA but also branched-chain fatty acids, amines, indoles, sulfides, and phenols (Tuohy, Conterno, Gasperotti, Viola, 2012).

Significant changes in bifidobacterial numbers were observed in response to juçara after 24 h of fermentation. Bifidobacteria are recognized as one of the most important bacterial groups associated with human health providing beneficial effects in the large intestine (Gibson, Wang, 1994; Russel, Rossa, Fitzgerald, Stanton, 2011). It is well known that an increase in bifidobacteria number is favoured by the presence of mainly carbohydrates. However, studies have showed that some phenolic compounds, such as anthocyanins and gallic acid have also the ability to promote the growth of the *Bifidobacterium* and *Lactobacillus* spp. (Gibson, 1999, Aura et al., 2005, Tzounis et al., 2008, Hidalgo et al., 2012).

The juçara fermentation also increased populations of *Bacteroides* spp. and *Clostridium* cluster XIVa, and although both groups may exert a detrimental effect on colon health due to an association with some metabolites, these groups also contain saccharolytic species which can produce large concentrations of beneficial SCFAs from sugars. Therefore, an increase in populations of *Clostridium* spp. and *Bacteroides* spp., is partially dependent on the precursor substrate to which they are exposed (Gibson, Roberfroid, 1995; Nyangale, Farmer, Keller, Chernoff, Gibson, 2014). Here, residual carbohydrates could be associated with saccharolytic species. The increase of the tested bacterial groups, showed that the anaerobic microbiota were kept feasible in our system, and could ferment the substrates.

After 4 h of fermentation, numbers of the detrimental group *Clostridium histolyticum* were too low for being detected and a decrease in its numbers can provide an additional information in terms of the specificity for beneficial bacteria during juçara fermentation. The antimicrobial effect on certain bacterial groups for juçara fermentation, can be also related to the presence of phenolic compounds which, in accordance to previous studies, could inhibit the growth of potentially negative bacteria (Hidalgo et al., 2012).

From the present study it is not possible to conclude if the changing microbial population and the SCFA production is an effect of fibers or polyphenols, likely could be a combination of both, since *in vitro* studies with the isolated compounds showed that both can be metabolised by gut microbiota and exerts an increase in the beneficial species (Gibson, Roberfroid, 1995; Aura et al., 2005; Fleschhut et al., 2006). In the same way, there are some evidences from animal and human studies with whole plant foods, that it also can exert significant effects on the human gut microbiota (Vendrame, Gyglielnetti, Riso, Arioli, Klimis-Zacas, Porrini, 2011; Tuohy et al., 2012), however just few studies have considered the possible synergistic activity of fiber and polyphenols (Tuohy et al., 2012).

Juçara fermentation *in vitro* induced a modulation of the colonic microbiome with increased acetate and propionate. The most known metabolic pathways to acetate and propionate production from gut bacteria, are from the metabolism of polysaccharides. The acetate production occurs mainly through fructose-6-phosphate phosphoketolase pathway by bifidobacteria, and a higher production of this acid could be related to the increase of this bacteria (Miller, Wolin, 1996). According to Hosseini, Grootaert, Verstraete, Wiele (2011), propionate can be produced from fermentable carbohydrates by two pathways. The first one suggest that propionate is formed through decarboxylation of succinate by the presence of *Bacteroides fragilis* and *Propionibacterium* spp groups, while the other one, the propionate production follow the acrylate pathway, which pyruvate is firstly reduced to lactate by lactate dehydrogenase by the presence of Cluster IX of Clostridia groups, and an increase in those bacterial groups was observed for juçara fermentation. And although the type of polysaccharides of juçara pulp is not been characterized yet, reports from açai pulp (*Euterpe precatoria* and *Euterpe oleracea*), show the presence of arabinogalactans, with a β -(1-3)-linked galactan, arabino-3-6-galactans, α -rhamnopyranose, β -galactopyranose, α -arabinofuranose and α -galacturonopyranose

(Holderness et al., 2011), which are known to be degraded by the colonic microbiota to produce SCFA (Terpend, Possemiers, Daguët, Marzorati, 2013).

The amount of acetate and propionate produced from juçara fermentation was similar to the positive control (FOS-Raftilose 95) at 24 h of fermentation. Numerous *in vivo* and *in vitro* studies proved that FOS can modulate the gut through the selective stimulation of the gut microbiota (Gibson, Roberfroid, 1995, Gibson, Probert, Van Loo, Rastall, Roberfroid, 2004). The SCFA produced by gut microbiota in the colon have an important role. Butyrate is often associated as an energy source for the epithelium cells and acetate plays an important role in controlling inflammation and combating pathogen invasion (Russel, Hoyles, Flint, Dumas, 2013). Also, acetate and propionate may have a direct role in central appetite regulation. The mechanism for propionate is in stimulating release of the anorectic gut hormones peptide YY (PYY) and glucagon like peptide-1 (GLP-1). They in turn are involved in the short-term signal of satiation and satiety to appetite centres of the brain, increasing satiety and reducing food intake in animals and man (Tolhurst et al., 2012; Cherbut et al., 1998; Brown et al., 2003; Chambers et al., 2014). Acetate administration is associated with activation of acetyl-CoA carboxylase and changes in the expression profile of regulatory neuropeptides favouring appetite suppression (Frost et al., 2014). This way, our results support the hypothesis that through an increase of some bacterial groups and the subsequent production of different amounts of SCFAs, juçara could exert a beneficial role for the host.

In this study, anthocyanins and phenolic compounds from juçara pulp, during a simulated *in vitro* digestion were monitored and a decrease in these compounds was observed. This result could be due to anthocyanins being metabolized, oxidized, or degraded into other chemicals (Pérez-Vicente., Gil-Izquierdo, Garcia-Viguera, 2002). However, for those anthocyanins that do decompose, there seems to be a delay between the loss of anthocyanin aglycones and the formation of phenolic acids, probably due to the relatively stable transition products. This delay could further reduce concentrations of phenolic acids in the upper gastrointestinal tract (Fang, 2014), which explains a lower increase in the present study. Besides, from previous studies on simulated human gastrointestinal digestion authors have shown that anthocyanins are less stable at an elevated pH of the small intestine (Perez-Vicente et al., 2002; McDougall, Fyffe, Dobson, Stewark, 2007).

The juçara pulp is composed mainly by carbohydrates and fat content (Table 1), and previous studies have been reported that the food matrix can also influence the phenolic compounds bioavailability during digestion (Lesser, Cermak, Wolfram, 2004; Sengul, Surek, Nilufer-Erdil, 2014). Sengul et al. (2014) evaluated the consumption of pomegranate phenolic compounds with several foods or food components, including cellulose, citric acid, sugars and salt. The authors observed that these components could negatively affect the total phenolic content depending of the digestion stage and, when the carbohydrates lactose, fructose and glucose were digested together with phenolic, an about 2 fold decrease in these compounds were detected in the dialysed fraction. On the other hand, the oil content during digestion can present a preserving effect on phenolic compounds (Sengul et al., 2014) and the higher quercetin content after juçara dialysis, can be related to the delay in absorption and metabolism of the oil content that resulted in more quercetin absorption as reported by Lesser, Cermak, Wolfram (2004).

Alongside the fermentation time, the amount of total phenolics was kept constant and similar results were also reported by Correa-Betanzo, Allen-Vercoe, McDonald, Schroeter, Corredig, Paliyath (2014), who observed a constant level of the total phenolic compounds from blueberry extracts, both crude and digested, during simulated colon fermentation.

Although in the present study the remaining phenolic compounds were not completely identified, colonic bacteria are well known to act enzymatically on the polyphenolic backbone of the remaining unabsorbed polyphenols and produce different compounds with physiological significance (Aura et al., 2005). According to previous studies, syringic and gallic acids are mainly products of malvidin-3-glycoside degradation (Fleschhut, Kratzer, Rechkemmer, Kulling, 2006; Hidalgo et al., 2012) and ferulic and protocatechuic acids from cyanidins biotransformation (Keppler, Humpf, 2005; Flores, Castillo, Costabile, Klee, Guergoletto, Gibson, 2015). Also the heterocyclic C-ring of anthocyanins can be broken and degraded into phloroglucinol derivatives (from A-ring) and benzoic acids (from the B-ring) and both phloroglucinol aldehyde and its oxidation product, phloroglucinol acid, have been detected following the degradation of anthocyanins (Cueva et al., 2013). However future work will be done to identify the degradation products from juçara pulp phenolic compounds during fermentation by gut bacteria.

In vitro and *in vivo* intervention and epidemiological studies have shown evidences on the wide range of health promoting activities of dietary polyphenols, including their anti-inflammatory, antioxidant, anticarcinogenic, antiadipogenic, antidiabetic and neuroprotective potentials, suggesting an association between the consumption of polyphenol-rich foods and a reduced risk of several chronic diseases (Jennings, et al., 2012; Hooper et al., 2012), and these benefits could be related to the remaining phenolic components after degradation products by the colonic microbiota as observed in the present study and reported by other authors (Cardona et al., 2013), as the hydrolysis by the gut microbiota can increase the bioavailability of polyphenols, breaking down many complex polyphenols into smaller phenolic acids, which can be absorbed across the intestinal mucosa (Tuohy et al., 2012).

2.5. CONCLUSION

This study provides new insights about the numbers of bacteria population and the degradation of juçara phenolic compounds during digestion and fermentation in the colon. Following juçara pulp fermentation, beneficial modulations were seen in terms of bifidogenic effects. However, future works will explore which, polyphenols or fibers, is the main effect of juçara modulation and the role such changes play in human health.

ACKNOWLEDGEMENTS

We would like to thank Bimini Farm for the juçara berries used on the study. We also like to thank CAPES (Brazil), for a scholarship to K. B. G. Process number 004163/2014-01.

2.6. REFERENCES

Aura, A. M., Martin-Lopes, P., O'Leary K. A., Williamson, G., Oksman-Caldentey, K. M., Poutanen, K., Santos-Buelga, C. (2005). *In vitro* metabolism of anthocyanins by human gut microflora. *European Journal of Nutrition*, 44, 133–142.

Borges, G. da S. C., Vieira, F. G. K., Copetti, C., Gonzaga, L. V., Zambiasi, R. C., Filho, J. M., Fett, R. (2011). Chemical characterization, bioactive compounds, and antioxidant capacity of Jussara (*Euterpe edulis*) fruit from the Atlantic Forest in southern Brazil. *Food Research International*, 44, 2128-2133.

Brown, A. J., Goldsworthy, S. M., Barnes, A. A., Eilert, M. M., Tcheang, L., Daniels, D., Muir, A. I., Wigglesworth, M. J., Kinghorn, I., Fraser, N. J., Strum, J. C., Steplewski, K. M., Murdock, P. R., Holder, J. C., Marshall, F. H., Szekeres, P. G., Wilson, S., Ignar, D. M., Foord, S. M., Wise, A., Dowell, S. J. (2003). The Orphan G protein-coupled receptors GPR41 and GPR43 are activated by propionate and other short chain carboxylic acids. *Journal of Biological Chemistry*, 278, 11312–19.

Cardona, F., Andres-Lacuerva, C., Tulipaniana, S., Tinahonesb., F. J., Queipo-Ortuno, M. I. (2013). Benefits of polyphenols on gut microbiota and implications in human health. *Journal of Nutritional Biochemistry*, 24, 1415-1422.

Carvalho-Wells, A. L., Helmolz, K., Nodet, C., Molzer, C., Leonard, C., McKevith, B., Thielecke, F., Jackson, K. G., Tuohy, K. M. (2010). Determination of the in vivo prebiotic potential of a maize-based whole grain breakfast cereal: a human feeding study. *British Journal of Nutrition*, 1353–1356.

Chambers, E. S., Viardot, A., Psichas, A., Morrison, D. J., Murphy, K. G., Zac-Varghese, S. E. K., MacDougall, K., Preston, T., Tedford, C., Finlayson, G. S., Blundell, J. E., Bell, J. D., Thomas, E. L., Mt-Isa, S., Ashby, D., Gibson, G. R., Kolisa, S., Shillo, W. S., Blomm, S., Morley, W., Clegg, S., Frost, G. (2014). Effects of targeted delivery of propionate to the human colon on appetite regulation, body weight maintenance and adiposity in overweight adults. *Gut* Published Online First: 10 december 2014, 1–11. doi:10.1136/gutjnl-2014-307913.

Cherbut, C., Ferrier, L., Rozé, C., Anini, Y., Blottière, H., Lecannu, G., Galmiche, J. P. (1998). Short-chain fatty acids modify colonic motility through nerves and polypeptide YY release in the rat. *American Journal of Physiology*, 275(6 Pt 1), G1415–22.

Cohen, K. O. de, Alves, S. M. de,. (2006). Sistemas de Producao do Acai. *Embrapa Amazonia Oriental - Sistemas de Produção*, 4.

Correa-Betanzo, J., Allen-Vercoe, E., McDonald, J., Schroeter, K., Corredig, M., Paliyath, G. (2014). Stability and biological activity of wild blueberry (*Vaccinium angustifolium*) polyphenols during simulated in vitro gastrointestinal digestion. *Food Chemistry* 165, 522-531.

Cueva, C., Sánchez-Patán, F., Monagas, M., Walton, G. E., Gibson, G. R., Martín-Álvarez, P. J. Bartolome, B., Moreno-Arribas, V. (2013). *In vitro* fermentation of grape seed flavon-3-ol fraction by human faecal microbiota: changes in microbial groups and phenolic metabolites. *FEMS Microbiology Ecology*, 83, 792-805.

Cunha-Junior, L. C., Nardini, V., Khatiwada, B. P., Teixeira, G. H. de A., Walsh, K. B. (2015). Classification of intact açai (*Euterpe oleracea* Mart.) and juçara (*Euterpe edulis* Mart) fruits based on dry matter content by means of near infrared spectroscopy. *Food Control*, 50, 630-636.

Daims, H., Brühl, A., Amann, R., Schleifer, K. H., Wagner, M. (1999). The domain-specific probe EUB338 is insufficient for the detection of all bacteria: Development and evaluation of a more comprehensive probe set. *Systematic and Applied Microbiology*, 22, 434-444.

Daims, H., Stoecker, K. & Wagner, M. (2005). Fluorescence in situ hybridization for the detection of prokaryotes. In *Molecular Microbial Ecology*, Chapter 9, pp. 213-239. Edited by A. M. Osborn & C. J. Smith. Abingdon, UK: Garland Science.

De Brito, E. S., De Araújo, M. C. P., Alves, R. E., Carkeet, C., Clevidence, B. A., Noyotny, J. A. (2007). Anthocyanins present in selected tropical fruits: Acerola, Jambolão, Jussara, and Guajiru. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 55, 9389-9394.

Fang, J. (2014). Some anthocyanins could be efficiently absorbed across the gastrointestinal mucosa: extensive presystemic metabolism reduces apparent bioavailability. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 62, 3904-3911.

Fleschhut, J., Kratzer, F., Rechkemmer, G., Kulling, S. E. (2006). Stability and biotransformation of various dietary anthocyanins *in vitro*. *European Journal of Nutrition*, 45, 7-18.

Flores, G., Castillo del, M. L., Costabile, A., Klee, A., Guergoletto, K. B., Gibson, G. R. (2015). *In vitro* fermentation of anthocyanins encapsulated with cyclodextrins: Release, metabolism and influence on gut microbiota growth. *Journal of Functional Foods*, 16, 50-57.

Franks, A. H., Harmsen, H. J. M., Raangs, G. C., Jansen, G. J., Schut, F., Welling, G. W. (1998). Variations of bacterial populations in human feces measured by fluorescent *in situ* hybridization with group-specific 16S rRNA-targeted oligonucleotide probes. *Applied and Environmental Microbiology*, 64, 3336–3345.

Frost, G., Sleeth, M. L., Sahuri-Arisoylu, M., Lizarbe, B., Cerdan, S., Brody, L., Anastasovska, J., Ghourab, S., Hankir, M., Zhan, S. Carling, D., Swann, J. R., Viardot, A., Morrison, D., Thomas, E. L., Bell, J. D. (2014). The short-chain fatty acid acetate reduces appetite via a central homeostatic mechanism. *Nature Communication*, 5, 3611. DOI: 10.1038/ncomms4611.

Gibson, G. R., Wang, X. (1994). Regulatory effects of bifidobacteria on the growth of other colonic bacteria. *Journal of Applied Bacteriology*, 77, 412-420.

Gibson, G., Roberfroid M. (1995). Dietary modulation of the human colonic microbiota: introducing the concept of prebiotics. *Journal of Nutrition*, 125, 1401 - 1412.

Gibson, G. R. (1999). Dietary modulation of the human gut microbiota using the prebiotics oligofructose and inulin. *Journal of Nutrition*, 129, 1438-1441.

Gibson, G. R., Probert, H. L., Van Loo, J. A. E., Rastall, R. A., Roberfroid, M. B. (2004). Dietary modulation of the human colonic microbiota: updating the concept of prebiotics. *Nutrition Research Reviews*, 17, 259-275.

Harmsen, H. J. M., Elfferich, P., Schut, F., Welling, G. W. (1999). A 16S rRNA-targeted probe for detection of lactobacilli and enterococci in faecal samples by fluorescent in situ hybridization. *Microbial Ecology in Health Disease*, 9, 11,3–12.

Hidalgo, M., Oruna-Concha, M. J., Kolida, S., Walton, G, E., Kallithraka, S., Spencer, J. P. E., Gibson, G. R., Pascual-Teresa, S. (2012). Metabolism of anthocyanins by human gut microflora and their influence on gut bacterial growth. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 60, 3882-3890.

Holderness, J., Schepetkin, I. A., Freedman, B., Kirpotina, L. N., Quinn, M. T., Hedges, J. F., Jutila, M. A. (2011). Polysaccharides isolated from açai fruit induce innate immune responses. *PLoS ONE*, 6(2), 1-14.

Holzapfel, W. H., Haberer, P., Snel, J., Schillinger, U., Veld, J. H. J. H. (1998). Overview of gut flora and microbiota. *International Journal of Food Microbiology*, 41, 85–101.

Hooper, L., Kay, C., Abdelhamid, A., Kroon, P. A., Cohn J. S., Rimm, E. B., Cassidy, A., (2012). Effects of chocolate, cocoa, and flavan-3-ols on cardiovascular health: a systematic review and meta-analysis of randomized trials. *American Journal of Clinical Nutrition*, 95 (3), 740–751.

Hosseini, E., Grootaert, C., Verstraete, W., Wiele de, T. V. (2011). Propionate as a health-promoting microbial metabolite in the gut. *Nutrition Reviews*, 69 (5), 245-258.

Jennings, A., Welch, A. A., Fairweather-Tait, S. J., Kay, C., Minihane, A. M., Chowienczyk, P., Jiang, B., Cecelja, M., Spector, T., Macgregor, A., Cassidy, A. (2012). Higher anthocyanin intake is associated with lower arterial stiffness and

central blood pressure in women. *American Journal of Clinical Nutrition*, 96 (4), 781–788.

Keppler, K., Humpf, H. U. (2005). Metabolism of anthocyanins and their phenolic degradation products by the intestinal microflora. *Bioorganic & Medicinal Chemistry* 13, 5195-5205.

Langendijk, P. S., Schut, F., Jansen, G. J., Raangs, G. W., Kamphuis, G. R., Wilkinson, M. H. F. & Welling, G. W. (1995). Quantitative fluorescent in situ hybridisation of *Bifidobacterium* spp. with genus specific 16S rRNA targeted probes and its application in fecal samples. *Applied and Environmental Microbiology* 61, 3069–3075.

Lesser, S., Cermak, R., Wolfram, S. (2004). Bioavailability of quercetin in pig is influenced by the dietary fat content. *The Journal of Nutrition*, 134, 1508-1511.

Maccaferri, S., Klinder, A., Cacciatore, S., Chitarrari, R., Honda, H., Luchinat, C., Bertini, I., Carnevali, P., Gibson, G. R., Brigidi, P., Costabile, A. (2012). In vitro fermentation of potential prebiotic flours from natural sources: Impact on the human colonic microbiota and metabolome. *Molecular Nutrition and Food Research*, 00, 0-11.

Manach, C., Scalbert, A., Rémésy, C., Jiménez, L. (2004). Polyphenols: Food sources and bioavailability. *American Journal of Clinical Nutrition*, 79, 727–747.

Manz, W., Amann, R., Ludwig, W., Vancanneyt, M. & Schleifer, K. H. (1996). Application of a suite of 16S rRNA-specific oligonucleotide probes designed to investigate bacteria of the phylum cytophaga-flavobacter-bacteroides in the natural environment. *Microbiology* 142, 1097–1106.

McDougall, G. J., Fyffe, S., Dobson, P., Stewark, D. A. (2007). Anthocyanins from red cabbage – stability to simulated gastrointestinal digestion. *Phytochemistry*, 68, 1285–1294.

Miller, T. L., Wolin, M. J. (1996). Pathways of acetate, propionate, and butyrate formation by the human fecal microbial flora, 62 (5), 1589-1592.

Nyangale, E., Farmer, S., Keller, D., Chernoff, D., Gibson, G. R. (2014). Effect of prebiotics on the fecal microbiota of elderly volunteers after dietary supplementation of *Bacillus coagulans* GBI-30, 6086. *Anaerobe*, 30, 75 - 81.

Perez-Vicente, A., Gil-Izquierdo, A., Garcia-Viguera, C. (2002). In vitro gastrointestinal digestion study of pomegranate juice – phenolic compounds, anthocyanins, and vitamin C. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50, 2308–2312.

Rastall, R. A. Gibson, G. R., Gill, H. S., Guarner, F., Klaenhammer, T.R., Pot, B., Reid, G., Rowland, I. R., Sanders, M. E. (2005). Modulation of the microbial ecology of the human colon by probiotics, prebiotics and synbiotics to enhance human health: an overview of enabling science and potential applications. *FEMS Microbiology Ecology*, 52, 145-152.

Rigottier-Gois, L., Rochet, V., Garrec, N., Suau, A., Dore, J. (2003). Enumeration of bacteroides species in human faeces by fluorescent in situ hybridisation combined with flow cytometry using 16S rRNA probes. *Systematic and Applied Microbiology*, 26, 110-118.

Russel, D. A., Rossa, R. P., Fitzgerald, G. F., Stanton, C. (2011). Metabolic activities and propionic potential of bifidobacteria. *International Journal of Food Microbiology*, 149 (1), 88-105.

Russel, W. R., Hoyles, L., Flint, H. J., Dumas, M. (2013). Colonic bacterial metabolites and human health. *Current Opinion in Microbiology*, 16, 246-254.

Sánchez-Pátan, F., Cueva, C., Monagas, M., Walton, G. E., Gibson, G. R., Quintanilla-López, J. E., Labrón-Aguilar, R., Martín-Álvarez, P. J., Moreno-Arribas, M. V., Bartolomé B. (2012). In vitro fermentation of a red wine extract by human gut microbiota: changes in microbial groups and formation of phenolic metabolites. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 60, 2136-2147.

Sengul, H., Surek, E., Nilufer-Erdil, D. (2014). Investigating the effects of food matrix and food components on bioaccessibility of pomegranate (*Punica granatum*) phenolics and anthocyanins using an *in-vitro* gastrointestinal digestion model. *Food Research International*, 62, 1069-1079.

Terpend, K., Possemiers, S., Daguet, D., Marzorati, M. (2013). Arabinogalactan and fructo-oligosaccharide have a different fermentation profile in the Simulator of the Human Intestinal Microbial Ecosystem (SHIME®). *Environmental Microbiology Reports*, 5(4), 595-603.

Tzounis, X., Vulevic, J., Kuhnle, G. G. C., George, T., Leonczak, J., Gibson, G. R., Kwik-Urbe, C., Spencer, J. P. E. (2008). Flavonol Monomer-induced changes to the human faecal microflora. *British Journal of Nutrition*, 99, 782-792.

Tolhurst, G., Heffron H., Lam Y. S., Parker, H. E., Habib, A. M., Djakogiannaki, E., Cameron, J., Grosse, J., Reimann, F., Gribble, F. M. (2012). Short-Chain Fatty Acids Stimulate Glucagon-Like Peptide-1 Secretion via the G-Protein-Coupled Receptor FFAR2. *Diabetes*, 61, 364–71.

Tuohy, K. M., Conterno, L., Gasperotti, M., Viola, R. (2012). Up-regulating the human intestinal microbiome using whole plant foods, polyphenols and/or fiber. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 60, 8776–8782.

Vendrame, S., Guglielmetti, S., Riso, P., Arioli, S., Klimis-Zacas, D., Porrini, M. (2011). Six-week consumption of a wild blueberry powder drink increases bifidobacteria in the human gut. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 59, 12815–12820.

Walker, A. W., Duncan, S. H., McWilliam Leitch, E. C., Child, M. W., Flint, H. J. (2005). pH and peptide supply can radically alter bacterial populations and short-chain fatty acids ratios within microbial communities from the human colon. *Applied and Environmental Microbiology*, 71, 3692-3700.

CAPÍTULO III - JUÇARA (*EUTERPE EDULIS*) EXTRACT AS A SUBSTRATE FOR *LACTOBACILLUS REUTERI* LR92 AND *LACTOBACILLUS PLANTARUM* BG112 FERMENTATION: OPTIMISATION PROCESS AND ANTIOXIDANT ACTIVITY²

ABSTRACT

The fermentation of juçara extract (*Euterpe edulis*) by the probiotics *Lactobacillus reuteri* and *Lactobacillus plantarum* was examined using a central composite rotational experimental design, followed by an evaluation of the optimised fermentation conditions. The stability of the fermented product in terms of the viability of probiotics and antioxidant activity, was also monitored during 28 days under refrigeration at 4 °C. The optimised conditions were determined to be 32 °C with a pH of 5.7 for *Lactobacillus reuteri* fermentation and 25 °C with a pH of 5.0 for *Lactobacillus plantarum*; fermentation times were 30 h for both microorganisms. During the fermentation process, the probiotics showed similar patterns of growth, and caused an increase in total phenolic and antioxidant activity. After 28 days of refrigerated storage, the cell viability of probiotics in fermented juçara extract remained at 8.7 Log CFU/mL for both microorganisms, and an increase in antioxidant activity was also noticed. Juçara extract can be considered a new option for the development of non-milk probiotic beverage with high antioxidant compounds, since the process increased some beneficial compounds without losing cell viability.

Keywords: Probiotic, Experimental design, Jussara palm Fruit, phenolic, non-milk beverage.

² Situação: Submetido ao *Journal of Food Science and Technology*

GUERGOLETTTO, K. B.^{a*}; MAURO, C. S. I.^a; GARCIA, S.^a

^a Department of Food Science and Technology; State University of Londrina, Celso Garcia Cid Road, Km 380; C.P.: 6001; 86051-970; Londrina – PR, phone number: + 55 43 3371-4080

*email: karla2901@gmail.com, phone number: + 55 43 3343-2898

sgarcia@uel.br, phone number: + 55 43 3371-5966

3.1. INTRODUCTION

The juçara (*Euterpe edulis*) belongs to Arecaceae family and is popularly known as juçara, jçara or palmiteiro. The genus *Euterpe* contains approximately seven species that are distributed in the tropics. Belonging to the Atlantic forest of Brazil, juçara is mainly found in the states of Rio Grande do Sul, Santa Catarina, Paraná, São Paulo, Rio de Janeiro, Minas Gerais and Bahia (Borges et al., 2011).

The juçara is known for producing an excellent quality of palm heart with a high economic value; however, the plant has no regrowth mechanism, and its palm heart extraction causes the plant death. This palm tree also produces a round fruit with a glossy black pulp covering the seed, similarly to well-known açai berry (*Euterpe oleracea*) (De Brito et al., 2007).

Though the juçara is in danger of extinction due to illegal palm extraction, the utilisation of its fruit in foods presents a potential economic, environmental and nutritional alternative that could help preserve the species. The juçara berry is also rich in bioactive compounds with high antioxidant activity (Borges et al., 2011), and has mineral elements such as potassium, iron and zinc, in amounts close to or higher than those found in açai (Silva et al., 2004).

It is well-known that fruits and vegetables are important foods because of their excellent nutrients, vitamins, minerals, dietary fibre and antioxidants. However, they are perishable and not easily obtained depending on the season and region. For this reason, many technological resources can be employed to maintain or improve the safety, sensory properties and storage of fruits and vegetables.

To date, fermentation is widely used in the food industry to improve the sensory characteristics of a product as well as to eliminate certain undesirable constituents, make nutrients more accessible while preserving and improving the nutritional properties (Jaiswal, Abu-Ghannam, 2013). Besides, a fermentation by probiotic bacteria, could provide an additional health benefits, since the regular consumption of probiotic microorganisms, provides benefits such as the stimulation of the immune system, inhibition of pathogens, regulation of intestinal function, reduction in the serum cholesterol level, improvement in inflammatory bowel disease and suppression of *Helicobacter pylori* infection.

Even though most probiotic products are found in dairy based products, new scientific data has addressed the effects of fermented vegetable products on health, because of the high levels of beneficial substances in fruits, which, allied with the benefits of probiotics, can provide additional contributions to consumer health (Peres et al., 2012). However, the survival of probiotics and their growth is also affected by fermentation conditions such as pH, temperature, medium, species, strain, and interactions with other bacteria (Costa et al., 2013).

The 'one-at-a-time-approach' that is frequently used to obtain high viability or yields of the desired metabolic products in a microbial system, is extremely time-consuming when a number of factors have to be optimised; and moreover, it ignores the complex interactions between various physiochemical parameters (Abdel-Fattah et al., 2005). Statistical experimental design is an efficient approach to find out the optimal conditions for the targeted response. Response surface methodology (RSM) is a collection of mathematical and statistical techniques for searching optimum conditions of factors and desirable responses, to evaluate the relative significance of several affecting factors even in the presence of complex interactions (Jaiswal et al., 2012).

This study aimed to investigate the potential of juçara extract as cultivation media for two commercial probiotics strains, for further use as a new non-dairy probiotic product, applying a central composite rotational experimental design (2²). Besides, we also investigated the fermentation process and its influence on the antioxidant activity and the stability during refrigerate storage for 28 days.

3.2 MATERIAL AND METHODS

3.2.1 Juçara Extract

Juçara grains were collected during the 2012 harvest from *Euterpe edulis* palm trees produced at the Bimini Farm (Rolândia, Paraná, Brazil) and were kindly provided by Daniel Steidle (environmentalist). To obtain the extracts, the fruits were washed with clean water and sanitised for 30 min in water containing chlorine at a concentration of 200 mg/kg. Then, the grains were rinsed and pulped with clean water in a 2:1 (w/v) ratio using a planetary mixer (ARNO, Brazil) for 1 min at speed 1,

to preserve seed viability. The seeds were separated for planting and the extract was frozen in 250 mL portions.

Immediately prior to use, the extracts were thawed under refrigeration for 18 h and filtered, first through fabric to remove the sludge and then in the sequence of qualitative filter papers using a Büchner funnel under vacuum. After, the extracts pH was adjusted according to the central composite rotational experimental design (Table 1), using 3 N NaOH or 10% acetic acid, and pasteurised in a water bath at 80 °C for 1 min, followed by cooling in an ice bath. According to Brazilian regulations, NaOH can be used as a food additive functioning as an acidity regulator (ANVISA, 2007).

3.2.2 Juçara Extract Chemical Composition

The juçara extract chemical composition was characterized by reference methods: moisture, protein and ash (AOAC, 2006), lipids (Bligh & Dyer, 1959), soluble solids (°Brix) (Atago refractometer pocket, Japan), pH (potentiometer - Ion PH300) and sugars (Dubois, 1956). For the mineral content, sample were first digested with a mixture of HNO and HClO₄ in the ratio 2:1 (v / v), diluted with 50 mL deionised water and determined according to the methods of Silva (1999).

3.2.3 Microorganisms and Inoculum Preparation

The probiotic strains of *Lactobacillus reuteri* LR92 and *Lactobacillus plantarum* BG112 were provided by Clerici, Sacco (Italy) and the culture powder was kept frozen at concentration 0.01% (w/v) in pasteurised juçara extract containing 20% (v/v) sterile glycerol. Prior to testing, the pre-inoculum was obtained from two activations on juçara extract and incubation at 37 °C for 18 h.

3.2.4 Optimisation of *Lactobacillus reuteri* or *Lactobacillus plantarum* Growth in Filtered and Pasteurised Juçara Extract

The optimum fermentation conditions for both microorganisms were determined using a response surface methodology in a central composite rotational design (CCRD) consisting of a 2² factorial [with two levels (-1 and 1) and two factors,

x1 (initial pH) and x2 (incubation temperature, °C)], including four axial and three central points, totalling eleven randomly performed trials (Table 1). The initial pH ranged from 3.6 to 6.4 for *Lactobacillus reuteri* and 5.0 to 7.9 for *Lactobacillus plantarum*, and the temperature ranged from 10.8 °C to 39 °C for both bacteria. The experimental pH points were chosen based on preliminary growth tests using juçara extract for each microorganism and temperatures in a range in which lactobacilli can grow. The extracts at 10.8 °C, 15 °C and 25 °C were incubated in a BOD (Tecnal, Piracicaba, São Paulo, Brazil) and those at 35 °C and 39 °C were incubated in a greenhouse (Novatecnica, Piracicaba, São Paulo, Brazil).

For each experimental run with each microorganism, one percent of a pre-inoculum (containing approximately 10^8 cfu/mL) was added to screw cap glass vials containing 100 mL of pasteurised juçara extract to an initial count of 10^6 cfu/mL and this mixture was incubated for 48 h at different temperatures according to the experimental design (Table 1). The number of viable cells was determined at the end of incubation period using MRS agar (Himedia), and response variables were recorded as functions of Log CFU/mL.

A second order response surface model was used to fit the experimental data:

$$Y = \beta_0 + \beta_1x_1 + \beta_2x_2 + \beta_{11}x_1^2 + \beta_{22}x_2^2 + \beta_{12}x_1x_2 \quad (\text{Eq. 1}),$$

where Y = response function, x1 e x2 = coded independent variables, and β = estimated regression coefficients.

The regression and variance analysis (ANOVA) were performed using the software Statistica 7.0 (StatSoft Inc., Tulsa, USA) to estimate and test the significance ($p \leq 0.05$) of the parameters of mathematical models. The response surface graphics were constructed from the adjusted models and the desirability of the predicted values was evaluated.

3.2.5 Lactobacilli Growth and Fermentation Process

A lactobacilli growth study was conducted under optimal fermentation conditions designed using the response surface methodology (pH 5.7 and 32 °C for *L. reuteri*, and pH 5.0 and 25 °C for *L. plantarum*), with the aim of eliciting the appropriate fermentation time for the juçara extract matrix. Besides this, the total

phenolics content and antioxidant activity analysis were also conducted to verify the influence of fermentation parameters at juçara antioxidant activity.

3.2.6 Storage Stability

The juçara extract (150 mL in glass bottles) was fermented during 30 h under the optimised conditions determined by the growth study. After fermentation, the samples were stored in a cold room at 4 °C for 28 days and analysis of cell viable counts, total phenolics and antioxidant activity were determined every 7 days in triplicate to calculate the average of three repetitions.

3.2.7 Viable Cell Count Determination

The cellular viability was determined using the pour plate method. Fermented extract dilutions (1:9) were made with sterile peptone water (Himedia) 0.1% (w/v) followed by plating on agar Man-Rogosa-Sharp (MRS - Himedia) and incubation at 37 °C in anaerobic jars for 48 h (Pereira et al., 2011).

3.2.8 pH, Sugars and Lactic Acid Determination

The pH values of the samples during the growth study were determined through direct measurements in a potentiometer (Ion PH300) at 25 °C.

For sugars and lactic acid determination, the cultures were first centrifuged at 1000 xg for 10 min (MARK) and the supernatant was filtered using a Millex-GV, PVDF hydrophilic membrane (0.22 µm pore size; Millipore, Billerica, MA, USA).

The sugars (glucose, fructose, galactose and rhamnose) were analysed using high performance anion exchange chromatography (HPAEC). Aliquots (10 µL) of the filtrate (PVDF membrane, 0.22 µm, Millipore, Billerica, MA, USA) were automatically injected into the Ion Chromatography System (ICS5000, Dionex Canada Ltd., Oakville, Canada) coupled with pulsed amperometric detection (PAD, cell with disposable working gold electrode and pH-Ag/AgCl reference electrode, Dionex/Thermo Scientific) and equipped with a gradient pump (Model SP-5). The carbohydrates were separated using a CarboPac® PA1 analytical column [250 mm × 4 mm, 10 µm particle size, polystyrene/divinylbenzene (2% cross-linked) substrate

agglomerated with quaternary ammonium functionalised latex (5% cross-linked), Dionex CarboPac®] preceded by a CarboPac® PA1 guard column (50 mm × 4 mm). The chromatographic runs were performed at a flow rate of 1.0 mL/min at 30 °C with gradient elution using ultra-pure water (resistivity of 18.2 MΩ cm, solvent A) and 0.25 mol/L NaOH (solvent B). Furthermore, the column was washed for 10 min after each injection with 0.2 mol/L NaOH, and the eluent ratio was returned to the initial conditions after 33 min, for a total run time of 47 min. The polypropylene bottles containing mobile phases were continuously pressurised with nitrogen gas to minimise contamination with carbonate. A quadruple potential waveform was applied (E = potential, t = duration) using the following settings: E1 = +0.1 V, t1 = 400 ms; E2 = -2.0 V, t2 = 20 ms; E3 = +0.6, t3 = 10 ms; and E4 = -0.10, t4 = 70 ms. Integration occurred from 200 ms to 400 ms during the E1 application. Carbohydrate standards of glucose, fructose, rhamnose and galactose (all provided from Sigma, Brazil), were used to identify the different sugars on the basis of their retention times and for external calibrations solutions. Chromatogram analysis was carried out using Chromeleon version 6.8 software (Dionex Corporation). The carbohydrate concentrations were expressed as the mean ± standard deviation and in g of glucose, fructose, galactose or rhamnose per litre of sample.

The lactic acid production was determined via High Performance Liquid Chromatography (HPLC-Shimadzu) using a purification system equipped with a C18 column 5 µm ODS 1 (4.6 mm x 250 mm) (Waters Apherisorb, Ireland) and a UV detector operating at 210 nm. Elution was conducted at 20 °C with a flow rate of 0.2 mL/min using H₂SO₄ (2 mM) as the mobile phase.

3.2.9 Total Phenolic Analysis

The total phenolic content were analyzed according to Folin-Ciocalteu method (Fang, Bhandari, 2011) with some modifications, using gallic acid as the standard. 0.5 mL of the diluted extracts or standards were mixed with 2.5 mL of Folin-Ciocalteu reagent. After 5 min at 50 °C, 2 mL of sodium carbonate saturated solution was added and the absorbance of the samples were measured at 760 nm using a spectrophotometer (Libra S22, Biochrom, Cambridge, UK). Methanolic solutions of gallic acid (Sigma-Aldrich,) with concentration of 0.1 to 0.5 mM were

used for the calibration curve, and results were expressed as g gallic acid equivalents (GAE)/g or L of sample.

3.2.10 Antioxidant Activity

Both DPPH• and ABTS⁺• methods were used to determine free radical-scavenging potential of each sample.

The DPPH• was performed according to Brand-Williams et al. (1995) with modifications. Aliquots of 0.05 mL of each extract was added to 1 mL of acetate buffer (pH 5.5), 1 mL of absolute ethanol and 0.5 mL of DPPH• solution (250 µmol/L). The absorbance was measured at 517 nm after 30 min of reaction in dark at 25 °C. The quantification was calculated by standard Trolox curve (0.5 to 20 µmol/L) and the results expressed in micromol Trolox per milliter of sample.

The ABTS⁺• (2,2 'azinobis (3-ethylbenzothiazoline sulfonic acid-6) was carried out according to Sanches-Gonzales et al. (2005) with modifications. Before analysis, the ABTS⁺• (7 mM to 2.45 mM potassium persulphate) solution was prepared in the dark for 16 h. Upon analysis, the solution was diluted with sodium phosphate buffer (pH 7.4) to provide absorbance 0.7 ± 0.02 at 730 nm. The analysis took place by adding 30 µL of sample and 6 mL of the diluted solution of ABTS⁺• and, after 6 minutes of reaction, the absorbance was read at 730 nm. The quantification was based on standard curve of Trolox (2.5 to 20 mM) and results expressed in micromol Trolox per milliliter of sample.

3.3. RESULTS AND DISCUSSION

3.3.1 Chemical and Mineral Composition of Juçara Extract

The chemical and mineral composition of the juçara extract used as substrate for probiotic fermentation is shown in Table 2. The protein and lipid contents of the extract were lower than those obtained by Borges et al. (2011), who observed a variation of 5.13 to 8.21% (DB) protein and 18.45 to 44.05% (DB) lipids in different analysed cultivars. Regarding the mineral composition, higher amounts of potassium in relation to the other minerals were found in the extract, followed by calcium, magnesium and phosphorus. The levels of iron in the present study were similar to

those observed by Garbin (2011), (1.39 mg/100 g); however, the results were higher for the other minerals (Ca: 16.88 mg/100 g, Mg: 5.25 mg/100 g, Mn: 0.26 mg/100 g, Zn: 0.25 mg/100 g and K: 5.51 mg/100 g). It was demonstrated from previous studies, that similar to other types of fruits, latitude, location of growth and harvest can significantly alter the chemical composition of juçara fruits (Borges et al., 2011).

Table 1. Experimental design (2²) with real and coded values (in parentheses) for the variables and results of *Lactobacillus reuteri* (LR) and *Lactobacillus plantarum* (LP) grown in filtered juçara extract after 48 hours of fermentation (Log CFU/mL).

Assay	Initial pH LR	Initial pH LP	Fermentation temperature (°C)	Log CFU/mL LR	Log CFU/mL LP
1	4.0 (-1)	5.5 (-1)	15±0.5 (-1)	7.20±0.12	8.45±0.02
2	4.0 (-1)	5.5 (-1)	35±0.5 (+1)	8.54±0.06	8.63±0.18
3	6.0 (+1)	7.5 (+1)	15±0.5 (-1)	8.69±0.36	8.59±0.33
4	6.0 (+1)	7.5 (+1)	35±0.5 (+1)	8.70±0.50	8.10±0.02
5	3.6 (-1.41)	5.0 (-1.41)	25±0.5 (0)	7.49±0.09	8.81±0.10
6	6.4 (+1.41)	7.9 (+1.41)	25±0.5 (0)	8.83±0.23	9.04±0.12
7	5.0 (0)	6.5 (0)	10.8±0.5 (-1.41)	6.78±0.02	7.26±0.04
8	5.0 (0)	6.5 (0)	39.0±0.5 (+1.41)	8.78±0.10	7.72±0.05
9	5.0 (0)	6.5 (0)	25±0.5 (0)	8.93±0.05	8.81±0.04
10	5.0 (0)	6.5 (0)	25±0.5 (0)	8.90±0.10	8.83±0.03
11	5.0 (0)	6.5 (0)	25±0.5 (0)	8.91±0.07	8.83±0.05

Table 2. Chemical (w.b) and mineral (d.b) composition of juçara extract used for fermentation.

Chemical	Mean value ± Standard deviation	Mineral*	Mean value ± Standard deviation
Moisture (%)	97.11 (±0.10)	P	11.2 (±1.10)
Protein (%)	0.089 (±0.04)	K	191.3 (±14.0)
Lipids (%)	0.08 (±0.02)	Mg	13.0 (±0.30)
Soluble solids (°Brix)	4.30 (±0.20)	Ca	35.4 (±7.00)
Ash (%)	0.002 (±0.00)	Mn	0.9 (±0.07)
pH	4.90 (±0.10)	Fe	1.2 (±0.60)
Sugars (%)	2.80 (±0.25)	Zn	0.45 (±0.01)
Total fibres (%)	ND		

ND: Not detected

* Results expressed as mg.100 g⁻¹

3.3.2 Optimisation of *Lactobacillus reuteri* and *Lactobacillus plantarum* Growth in Juçara Extract

Since probiotic bacteria are found mainly in dairy products, is important to study and determine the better conditions for fermentation in vegetable source, for this reason a experimental design was carried out to evaluate the effect of initial pH

and fermentation temperature on *L. reuteri* and *L. plantarum* growth in juçara extract and the results are presented in Table 1.

According to the results, there are distinctly different behaviours between the two microorganisms under the different conditions tested. Temperatures below 15 °C were not favourable for the growth of *L. reuteri* and a slight increase was observed for *L. plantarum* when extreme temperatures (10.8 and 39 °C) were used. This behaviour confirms the mesophilic characteristics of the studied strains because low and high temperatures were not favourable for growth of both.

Estimated effects of the independent variables ($x_1 = \text{pH}$ and $x_2 = \text{incubation temperature}$) on the response ($Y = \text{Log CFU/mL}$) are presented in Table 3. According to these results, the *L. reuteri* growth was influenced by the initial pH and incubation temperature. Both quadratic effects were negative, indicating the presence of a maximum bacterial growth. For *L. plantarum*, only the quadratic term of incubation temperature (x_2 variable) had a significant effect ($p=0.002$) on viability, indicating the region of greatest response.

The results shown in Table 1 were subjected to analysis of variance (ANOVA) and adjusted to a quadratic model, which equations 2 and 3, were obtained for the cell growth of *L. reuteri* and *L. plantarum*, respectively, in Log CFU/mL.

LR: Viability (Log CFU/mL) = $8.91 + 0.44\text{pH} - 0.30\text{pH}^2 + 0.52T - 0.49T^2 - 0.33\text{pH} \times T$
(Eq. 2)

LP: Viability (Log CFU/mL) = $8.82 + 0.109\text{pH}^2 - 0.61T^2 - 0.17\text{pH} \times T$ (Eq. 3)

In Eqs. 2 and 3, $T = \text{temperature (}^\circ\text{C)}$ and $\text{pH} = \text{pH values}$.

The model obtained for *L. reuteri* growth was significant at the 95% of confidence level, since calculated value F (12.68) was higher than the tabulated value F (5:05). The determination coefficient for the regression was 0.92, indicating that the model could be used as a predictor and was therefore used to generate the response surface (Figure 1A). Similarly, the model obtained for *L. plantarum* was statistically significant at the 95% of confidence interval, and again, the calculated value of F (11:56) was higher than the tabulated value F (4:53). The percentage of

variance explained by this model was 89%, and the response surface was built and is shown in Figure 1B.

Table 3. Estimated effects of initial pH and fermentation temperature (T °C) on *L. reuteri* (LR) and *L. plantarum* (LP) grown in juçara extract.

Factor	Effect (Log CFU/mL)		Standard error		P value	
	LR	LP	LR	LP	LR	LP
Average	8.91	8.82	0.17	0.14	0.000*	0.000*
pH (L)	0.88	-0.02	0.21	0.17	0.009*	0.93
pH (Q)	-0.6	0.22	0.26	0.20	0.069	0.33
T°C (L)	1.04	0.08	0.21	0.17	0.004*	0.64
T°C (Q)	-0.98	-1.21	0.25	0.20	0.013	0.002*
pH x T°C	-0.66	-0.33	0.30	0.24	0.08	0.22

* Statistically significant at 95% of confidence level ($p \leq 0.05$).

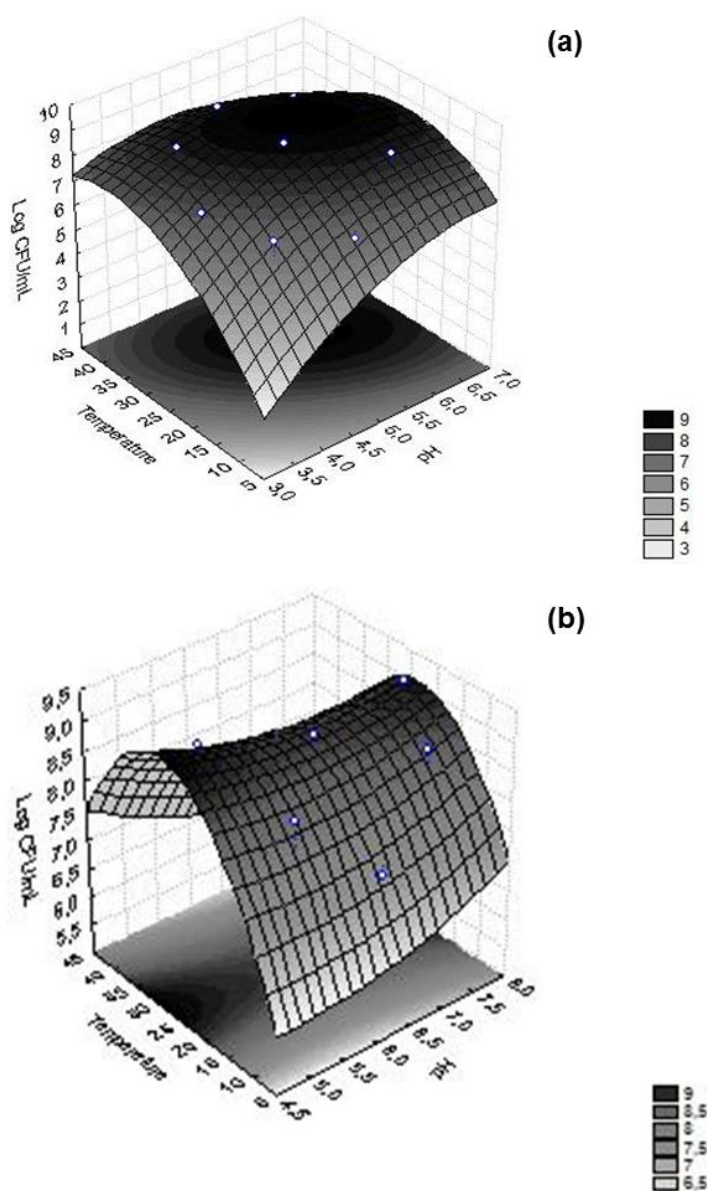
It was verified that at the temperature of 15 °C, an increase in *L. reuteri* growth occurred when the pH value ranged from 4.0 to 6.0 (Figure 1A). In the same way, increasing temperature also increased cell viability, reaching a maximum in the range of pH 5.0 to 6.4 and temperatures between 25 and 35 °C. Through an analysis of desirability, the optimal conditions for *L. reuteri* growth in juçara extract were calculated based on the binomial pH x T, resulting in an initial pH of 5.7 and a fermentation temperature of 32 °C.

For *L. plantarum* growth (Figure 1B), the pH (x1) variation in the studied range exerted little influence on viability. However, the variable x2 (incubation temperature) resulted in lower probiotic growth at higher (above 35 °C) or lower (below 15 °C) values than in the range of 20 °C and 30 °C. The best growth was observed at 25 °C and at pH values of 5.0 and 7.9. As the pH of the juçara extract in natura was approximately 4.9, choosing an initial pH of 5.0 is more desirable than the 7.9 value because it may result in reduced costs associated with extract neutralisation and prevent operational risks with material contamination.

The results observed for *L. reuteri* and *L. plantarum* growth in juçara extract were similar from those found by other authors in different vegetables. Yoon et al. (2006), studying the fermentation of sterilised cabbage juice by *L. plantarum*, *L. casei* and *L. delbrueckii*, reported a growth of approximately 8.00 Log CFU/mL with 48 h of fermentation at 30 °C. Pereira et al. (2011), fermenting cashew apple juice with *L.*

casei, found optimised values of pH 6.4 and 30 °C fermentation temperature. Costa et al. (2013) obtained optimised fermentation conditions with *L. casei* in sonicated pineapple juice with a pH of 5.8 and an incubation temperature of 31 °C. In the latter two studies, a slight variation in conditions that resulted in higher biomass and viability were observed. According to Pereira et al. (2011), the effects of initial pH and growth temperature depends on the substrate and the strain studied; therefore, the utilisation of the optimisation tool is an important step when studying new plant matrices for the growth of probiotic bacteria.

Figure 1. Response surface and profiles for the predicted values of *L. reuteri* (a) and *L. plantarum* (b) growth in juçara extract (*Euterpe edulis*). Viability results are expressed in Log CFU/mL.



3.3.3 Fermentation process

The optimum conditions for the growth of *L. reuteri* (pH 5.7 and incubation temperature 32 °C) and *L. plantarum* (pH 5.0 and incubation temperature 25 °C) in juçara extract obtained in the optimisation tests, were used to evaluate the growth and fermentation time. Figure 2 represents the viability of *L. reuteri* (A) and *L. plantarum* (B) and the pH of the extract during fermentation for 72 h. It was observed that both microorganism required the same fermentation time to achieve similar count numbers, and between 24 and 32 hours of fermentation, *L. reuteri* and *L. plantarum* reached a maximum growth in the juçara extract, with a viable count number of 8.8 ± 0.2 Log CFU/mL and 8.6 ± 0.2 Log CFU/mL respectively. After this period a stationary phase was reached. When bacteria enter to the stationary phase, they generally become more resistant during process stress conditions and storage period. This is due to the exhaustion of available food sources that triggers a stress response and allows the survival of the cell population (Meng et al., 2007).

Cell viability is the main factor to be considered in functional probiotic products. However, stopping the fermentation at 30 h, apart from obtaining the highest number of viable cells, a lower pH values of 4.1 ± 0.2 for *L. reuteri* and 4.5 ± 0.3 for *L. plantarum*, was achieved from the acid formation, which increases safety during storage and prevents the development of pathogenic bacteria (Costa et al., 2013).

The pH decrease caused by lactic acid production occurred from the consumption of sugars present in the juçara extract during lactobacillus growth (Figure 2C,D,E). These results are in agreement with other studies (Costa et al., 2013; Di Cagno et al., 2011; Yoon et al., 2006.) that suggest that different vegetables such as tomato, cashew, cabbage, and banana can serve as adequate growth substrate for lactic acid bacteria, resulting in high numbers and lactic acid production.

The major sugars present in the unfermented extract were glucose (1.7 ± 0.1 g/L), fructose (1.1 ± 0.1 g/L) and trace amounts of galactose (0.015 ± 0.001 g/L). Both microorganisms used glucose for growth and resulted in lactic acid production; however, a rapid consumption by *L. reuteri* occurred, and after 16 hours, only traces of this sugar were detected. After 40 h of fermentation by *L. reuteri*, nearly all fructose present in the media was consumed. In contrast, the extract fermented by *L. plantarum* showed a gradual decrease in glucose rate, with a total consumption

achieved after 72 h of fermentation, and a small amount of fructose was fermented during the study period.

The differences in sugar consumption with different fermentation times may have also caused differences in lactic acid production; *L. reuteri* reached the highest concentration after 48 h of fermentation, and *L. plantarum* took 72 h to achieve the same concentration (Figure 2E).

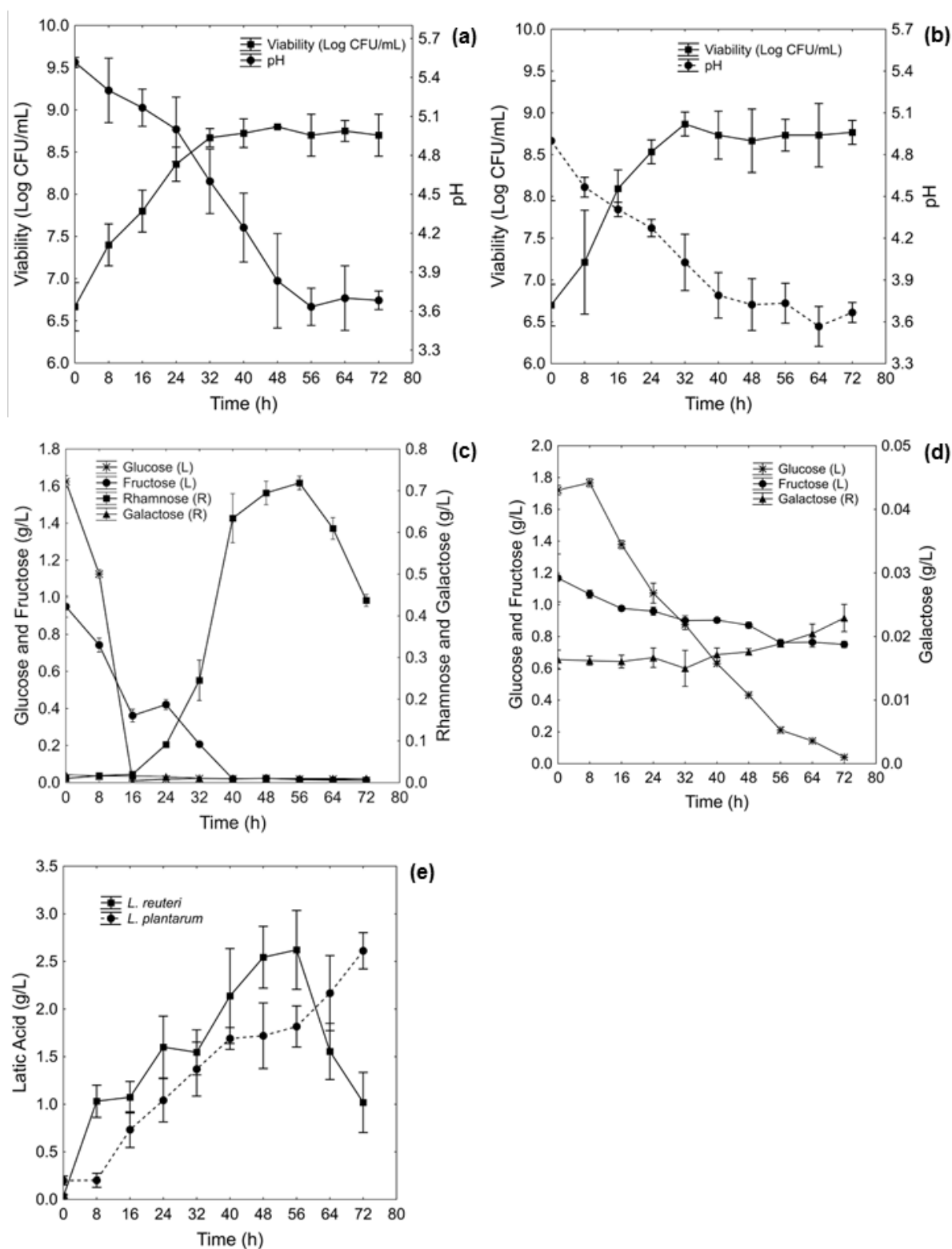
After 16 h of fermentation with *L. reuteri*, the appearance of rhamnose was observed on the growth medium, which increased during the fermentation period, reaching a maximum at 56 h (Figure 2C). From 64 h, a decrease in this sugar concentration was observed, which may have been caused by sugar consumption by the bacteria, since during this period the other carbohydrates sources had already become exhausted. The rhamnose present after 16 h of fermentation may have originated from the breaking of the cyanidin-3-rhamnoside molecule. According to De Brito et al. (2007), this anthocyanin is found at a concentration of 7 mg/100 g (d.b) in juçara (*Euterpe edulis*) and some types of LAB, such as *Lactobacillus* (including *Lactobacillus reuteri*), *Streptococcus*, *Enterococcus*, and *Weissella*, isolated from human faeces has β -glucosidase activity (Hayek, 2013; Otieno et al., 2005) and may act directly on anthocyanin, forming aglycones with higher antioxidant capacities compared to glycosylated forms (Spagna et al., 2000).

Carbohydrate and organic acid metabolism by *Lactobacillus* sp. also varies with species and depends on the substrate and fermentation time (Hou et al, 2000; Wang et al, 2003.). Mousavi et al. (2011), evaluating the pomegranate fermentation process with the probiotics *L. plantarum*, *L. delbrueckii*, *L. paracasei* and *L. acidophilus*, found that all species were able to grow and metabolise glucose and fructose; however, the consumption was higher with *L. plantarum* than *L. delbrueckii*.

3.3.4 Total Phenolics and Antioxidant Activity During Fermentation

The total phenolics and antioxidant activity by DPPH• and ABTS•+ of the juçara extract during fermentation by probiotics are shown in Table 4. According to Roginski and Lissi (2005), to estimate the antioxidant activity in matrices such as food and biological fluids, the use of more than one method is often appropriate since they are limited and differ in duration and measurement.

Figure 2. Viability and pH of *L. reuteri* (a) and *L. plantarum* (b); sugar consumption by *L. reuteri* (c) and *L. plantarum* (d) and the lactic acid production of both microorganisms (e) during fermentation of juçara extract in optimised conditions.



Fermentation with both microorganisms showed a significant increase in phenol content and in antioxidant activity measured by the DPPH• method. Moreover, for ABTS+• method, an increase of 50% in antioxidant activity was observed only for samples fermented with *L. reuteri*.

Table 4. Values of total phenolic and antioxidant activity by DPPH• and ABTS+• methods during juçara fermentation by *L. plantarum* and *L. reuteri*.

Time (hours)	<i>L. reuteri</i>			<i>L. plantarum</i>		
	Total phenolics (mg GAE / 100mL)	DPPH (µg Trolox / 100 mL)	ABTS (µg Trolox / 100 mL)	Total phenolics (mg GAE / 100mL)	DPPH (µg Trolox / 100 mL)	ABTS (µg Trolox / 100 mL)
0	473.7±0.67 ^a	138.3±5.43 ^a	61.9±10.84 ^a	447.3±2.00 ^a	136.4±10.61 ^a	54.4±3.53 ^a
16	489.3±5.35 ^a	160.2±0.88 ^b	63.6±5.43 ^a	454.6±2.71 ^a	133.6±5.74 ^a	59.9±1.88 ^a
24	482.7±16.06 ^a	165.2±10.61 ^b	67.4±2.12 ^a	514.43±7.36 ^b	156.4±7.98 ^a	60.1±0.23 ^a
32	537.14±5.35 ^b	160.8±3.68 ^b	76.9±0.47 ^a	536.7±4.01 ^{b,c}	133.3±2.56 ^a	59.2±0.47 ^a
48	538±6.02 ^b	161.4±1.77 ^b	119.1±5.89 ^b	554.64±5.35 ^c	134.9±2.21 ^a	60.7±0.23 ^a
64	531.9±13.50 ^b	156.8±11.05 ^b	120.7±2.12 ^b	565.52±16.7 ^c	142.1±13.25 ^b	60.1±0.54 ^a
72	534.1±20.84 ^b	155.7±9.12 ^b	118.2±4.01 ^b	560.32±12.1 ^c	147.1±10.89 ^b	58.9±8.32 ^a

Different letters in the same column are statistically different according to Tukey test carried out at 95 % of confidence level.

The increased antioxidant activity, can be explained by the fact that during fermentation of juçara extract, the composition of bioactive compounds could be modified by LAB, since fermentation may induce structural breakdown of plant cell walls through the decreasing of pH that creates the condition for bound phenolic constituents to be released through enzymatic processes leading to the liberation and/or synthesis of various bioactive compounds. Therefore, as discussed before, lactic acid bacteria has β -glucosidase enzymes that could modify the contents and structure of anthocyanins, changing from glycosides to aglycon forms which results in increased antioxidant activity (Boskow-Hansen et al., 2002, Dordevic et al. 2010, Hunaefl et al., 2013).

A higher antioxidant capacity of fermented foods with probiotic bacteria may be influenced by factors such as microorganism species, pH, temperature, water content, solvent, fermentation time, kind of food and aerobic conditions (Hur et al., 2014). In terms of microorganism, some species have antioxidant enzymes such as superoxide dismutase (SOD), NADH oxidase, NADH peroxidase and catalase, which are regarded as important defences systems against oxidative stress. Additionally, studies suggest that the activity may also be related to proteins present in the cell

wall or cell surface compounds such as exopolysaccharides (Kullisaar et al., 2002; Li et al., 2012; Pan, Mei, 2010). Juarez et al., (2013) demonstrated that *L. reuteri* CRL1101 had the highest capacity to reduce inflammatory and oxidative damages during endotoxic shock between others strains of *Lactobacillus*, and this could be assigned to the capacity of its cell structure and their secreted molecules, which can explain the highest activity for *L. reuteri* in relation to *L. plantarum* found in the present study.

Although our study shows for the first time the influence of LAB fermentation in juçara extract, more detailed studies of the activities of relevant enzymes during fermentation are required to determine the exact mechanisms causing improved of the nutritional effects (Dordevic et al., 2010).

3.3.5 Storage Stability

The juçara extracts fermented for 30 h with *L. reuteri* (pH 5.7 and temperature of 32 °C) or *L. plantarum* (pH 5 and temperature 25 °C) were maintained in glass vials at 4 °C for 28 days, and cell viability and antioxidant analysis were conducted every 7 days.

During the 28 days of storage, the number of viable cells of *L. reuteri* and *L. plantarum* remained almost constant, maintaining numbers greater than 8.7 ± 0.3 Log CFU/mL until the end of the storage period (Table 5). According to Shah (2007), to produce beneficial effects, the probiotic bacteria must be available and viable at concentrations of at least 10^6 CFU/g.

Pereira et al., (2011), studying *L. casei* in cashew juice fermentation (30 °C for 16 h) with 42 days of refrigerated storage, reported an increased survival of the probiotic in the first 21 days of storage, and at the 35th day there was a small reduction in viable cell numbers.

The viability of microorganisms during storage is the most important issue to be considered in probiotic products and is dependent on factors such as oxygen levels within products, packaging oxygen permeability, fermentation time, and storage temperature in addition to factors such as a decrease in pH and organic acid accumulations in the medium resulting from fermentation (Pereira et al., 2011; Shah, 2000).

The antioxidant activity of fermented juçara extract for both *L. reuteri* or *L. plantarum* during refrigerated storage showed a significant increase determined by both radical sequestration methodologies (Table 5). This trend was also found by Di Cagno et. al., (2011), that evaluating mashed fermented cherry with addition of lactic starter culture, observed an increase in the intensity of DPPH• radical color loss during storage for 60 days, indicating the increase in antioxidant activity in this period.

This fact could be attributed to increases in the levels of aglycone forms caused by the conversion of existing anthocyanin by enzymes, such as β -glucosidase even at low temperatures (4 °C) (Otieno, Ashton, Shah, 2005; Moraes Filho, et al., 2014).

Therefore, the fermentation process could be considered a ideal method to preserve and improve nutritional properties of juçara extract even during storage, providing an additional health benefit by its consume.

Table 5. Viability of *L. plantarum* and *L. reuteri* (Log CFU/mL), total phenolic and antioxidant activity by DPPH• and ABTS+• of the fermented juçara extract for 28 days of storage at 4°C.

<u>Sample</u>	<u>Storage time (days)</u>	<u>Log CFU/mL</u>	<u>DPPH (μmol trolox/mL)</u>	<u>ABTS (μmol trolox/mL)</u>	<u>total phenolics (GAE/100mL)</u>
<i>L. plantarum</i>	0	8.89±0.05 ^a	148.3±12.21 ^a	58.3±3.53 ^a	546.1±5.35 ^a
	7	8.81±0.02 ^a	158.5±3.53 ^b	63.9±2.14 ^b	631.7±5.67 ^b
	14	8.73±0.06 ^b	160.5±3.76 ^b	74.4±2.36 ^b	705.1±9.37 ^c
	21	8.71±0.13 ^{ab}	163.0±6.70 ^{bc}	76.5±1.50 ^b	717.4±4.01 ^c
	28	8.73±0.05 ^b	170.7±6.88 ^c	81.8±1.41 ^b	635.3±1.33 ^b
<i>L. reuteri</i>	0	8.92±0.05 ^a	161.8±5.63 ^a	55.8±2.40 ^a	531.1±3.73 ^a
	7	8.85±0.03 ^a	167.6±1.32 ^b	71.3±1.26 ^b	706.4±2.77 ^b
	14	8.80±0.10 ^{ab}	172.4±1.30 ^b	74.1±0.47 ^b	726.3±6.12 ^c
	21	8.72±0.07 ^b	174.3±4.43 ^{bc}	75.3±2.36 ^b	674.9±5.83 ^d
	28	8.71±0.05 ^b	179.1±2.65 ^c	76.6±3.53 ^b	659.0±10.1 ^d

Different letters in the same column are statistically different according to Tukey test carried out at 95 % of confidence level.

3.4. CONCLUSION

Despite the great potential for the use of the juçara fruit (*Euterpe edulis*) in food, there are few studies evaluating its functional and technological properties and studies of this plant could contribute to the diversification of functional foods and to

the reduction of the extinction risk of this palm tree. This study showed that the pure juçara extract can be used as a carrier of probiotics, resulting in large numbers of viable cells under optimised conditions and can be kept for 28 days of storage under refrigeration. Also, the fermentation process can influence significantly food quality through the increasing of antioxidant activity, however further work on the degradation products identification and involved enzymes is required to improve our understanding of phenolic acid degradation by LAB.

ACKNOWLEDGEMENTS

We would like to thank Daniel Steidle from Bimini Farm for the jucara fruit used on the study. We also like to thank the *Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq)* Brazil, for financial support by Process number: 479623/2012-0 and in the form of scholarship for K. B. G.

3.5 REFERENCES

- Abdel-Fattah, Y. R., Saeed, H. M., Gohar, Y. M., El-Baz, M. A. 2005. Improved production of *Pseudomonas aeruginosa* uricase by optimization of process parameters through statistical experimental designs. *Process Biochemistry*, 40, 1707–1714.
- Anvisa. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (Brazilian Health Surveillance Agency). Informe Técnico (Technical Report) nº 3, 25 october 2007. Hidróxido de sódio (Sodium hidroxide) – INS 524. Brasília. Brazil.
- AOAC. Association of Official Analytical Chemists. 2006. Official Methods of Analysis of the Association of Official Analytical Chemists, 18th Ed.; AOAC Press: Gaithersburg, MD.
- Bligh, E. G., Dyer, W. J. 1959. A rapid method of total lipid extraction and purification. *Canadian Journal of Biochemical Physiology* 37, 911-917.
- Borges, G. da S. C., Vieira, F. G. K., Copetti, C., Gonzaga, L. V., Zambiasi, R. C., Filho, J. M., Fett, R. 2011. Chemical characterization, bioactive compounds, and antioxidant capacity of Jussara (*Euterpe edulis*) fruit from the Atlantic Forest in southern Brazil. *Food Research International* 44, 2128-2133.
- Boskov-Hansen, H., Andersen, M. F., Nielsen, L. M., Back-Knudsen, K. E., Meyer, A. S., Christensen, L. P., et al. 2002. Changes in dietary fibre, phenolic acids and activity of endogenous enzyme during rye bread making. *European Food Research and Technology*, 214, 33-42.

Brand-Williams W, Cuvelier ME, Berset C. 1995. Use of free radical method to evaluate antioxidant activity. *Lebensmittel-Wissenschaft Technologie (LWT)*. 28, 25-30.

Costa, M. G. M., Fonteles, T. V., Jesus de, A. L. T., Rodrigues, S. 2013. Sonicated pineapple juice as substrate for *L. casei* cultivation for probiotic beverage development: Process optimisation and product stability. *Food Chemistry*. 139, 261-266.

De Brito, E. S., De Araújo, M. C. P., Alves, R. E., Carkeet, C., Clevidence, B. A., Noyotny, J. A. 2007. Anthocyanins present in selected tropical fruits: Acerola, Jambolão, Jussara, and Guajiru. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 55, 9389-9394.

Di Cagno, R., Surico, R. F., Minervini, G., Rizello, C. G., Lovino, R., Servili, M., Taticchi, A., Urbani, S., Gobbetti, M. 2011. Exploitation of sweet cherry (*Prunus avium* L.) puree added of stem infusion through fermentation by selected autochthonous lactic acid bacteria. *Food Microbiology* 28, 900-909.

Dordevic, T. M., Siler-Marinkovic, S. S., Dimitrijevic-Brankovic, S. I. 2010. Effect of fermentation on antioxidant properties of some cereals and pseudo cereals. *Food Chemistry*, 124 (1), 957-963.

Dubois, M., Gilles, K. A., Hamilton, J. K., Rebers, P. A., Smith, F. 1956. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Analytical Chemistry* 28 (3), 350-356.

Garbín, V. P. 2011. Análise da atividade antimicrobiana dos extratos dos frutos, óleos das sementes e fungos isolados da palmeira juçara (*Euterpe edulis* Martius 1824). Dissertação de mestrado. Universidade Federal do Paraná, Curitiba.

Fang, Z., Bhandari, B. 2011. Effect of spray drying and storage on the stability of bayberry polyphenols. *Food Chemistry*. 129, 1139-1147.

Hayek, S., Shahbazi, A., Worku, M., Ibrahim, S. A. 2013. Enzymatic activity of *Lactobacillus reuteri* grown in a sweet potato based medium with the addition of metal ions. *Springerplus* 2: 465.

Hou, J. W., Yu, R. C., Chou, C. C. 2000. Changes in some components of soymilk during fermentation with *Bifidobacteria*. *Food Research International* 33, 393-397.

Hur, S. J., Lee, S. Y., Kim, Y. C., Choi, I., Kim, G. B. 2014. Effect of fermentation on the antioxidant activity in plant-based foods. *Food Chemistry*, 160, 346-356.

Hunaefl, D., Akumo, D. N., Smetanska, I. 2013. Effect of fermentation on antioxidant properties of red cabbages. *Food Biotechnology*, 27, 66-85.

Jaiswal, A. K., Gubta, S., Abu-Ghannam, N. 2012. Optimisation of lactic acid fermentation of York cabbage for the development of potential probiotic products. *International Journal of Food Science and Technology* 47, 1605-1612.

Jaiswal, A. K., Abu-Ghannam. 2013. Kinetics studies for the preparation of probiotic cabbage juice: Impact on phytochemicals and bioactivity. *Industrial Crops and Products* 50, 212-218.

Kullisaar T, Zilmer M, Mikelsaar M, Vihalemm T, Annuk H, Kairane C, Kilk A. 2002. Two antioxidative lactobacilli strains as promising probiotics. *International Journal of Food Microbiology*: 72: 215-224.

Li S, Zhao Y, Zhang L, Zhang X, Huang L, Li D, Niu C, Yang Z, Wang Q. 2012. Antioxidant activity of *Lactobacillus plantarum* strains isolated from traditional Chinese fermented foods. *Food Chemistry* 132, 1914-1919.

Moraes Filho, M. L. de, Hirozawa, S. S., Prudencio, S. H., Ida, E. I., Garcia, S. 2014. *Petit suisse* from black soybean: bioactive compounds and antioxidante properties during development process. *International Journal of Food Science and Nutrition* 65 (4), 470-475.

Mousavi, Z. E., Mousavi, S. M., Razavi, S. H., Emam-Djomeh, Z., Kiani, H. 2011. Fermentation of pomegranate juice by probiotic lactic acid bacteria. *World Journal Microbiology Biotechnology* 27, 123-128.

Meng, X. C., Stanton. F., Fitzgerald, C. D., Ross, R. P. 2007. Anydrobiotics: The challenges of drying probiotic cultures. *Food Chemistry* 106, 1406-1416.

Otieno, D. O., Ashton, J. F., Shah, N. P. 2005. Stability of β -glucosidade activity produced by *Bifidobacterium* and *Lactobacillus* spp. in fermented soymilk during processing and storage. *Journal of Food Science* 70 (4), M236-M241.

Pan D, Mei X. 2010. Antioxidant activity of an exopolysaccharide purified from *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* 12. *Carbohydrate Polymers* 80, 908-914.

Peres, C. M., Peres, C., Hernández-Mendoza, A., Malcata, F. X. 2012. Review on fermented plant materials as carriers and sources of potentially probiotic lactic acid bacteria: With an emphasis on table olives. *Trends in Food Science & Technology* 26 (1), 31-42.

Pereira, A. L. F., Maciel, T. C., Rodrigues, S. 2011. Probiotic beverage from cashew apple juice fermented with *Lactobacillus casei*. *Food Research International* 44, 1276-1283.

Roginski, V., Lissi, E. A. 2005. Review of methods to determine chain-breaking antioxidant activity in food. *Food Chemistry* 92, 235-254.

Sanchez-Gonzales I, Jiménez-Escrig A, Saura-Calixto F. 2005. In vitro antioxidant activity of coffee brewed using different procedures (Italian, Espresso and Filter). *Food Chemistry* 90, 133-139.

Shah, N. P. 2000. Symposium probiotic bacteria: Selective enumeration and survival in dairy foods. *Journal of Dairy Science* 83, 894-907.

Shah, N. P. 2007. Functional cultures and health benefits. *International Dairy Journal* 17 (11), 1262-1277.

Silva, F. C da. 1999. Manual de Análises Químicas de Solos, Plantas e Fertilizantes. EMBRAPA, 370p.

Silva, M. G. P. C., Barreto, W. S., Serôdio, M. H. 2004. Comparação nutricional da polpa dos frutos de juçara e de açaí. In: XVIII CONGRESSO BRASILEIRO DE FRUTICULTURA. Florianópolis, Santa Catarina, 22 a 26 de novembro de 2004. Anais...CD ROOM, Florianópolis, SC.

Spagna, G., Barbagallo, R. N., Pifferi, P. G., Blanco, R. M., Guisan, J. M. 2000. Stabilization of a β -glucosidase from *Aspergillus niger* by binding to an amine agarose gel. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, Amsterdam 11, 63-69.

Yoon, K. Y., Wooddams, E. E., Hang, Y. D. 2006. Production of probiotic cabbage juice by lactic acid bacteria. *Bioresource Technology* 97, 1427-1430.

Wang, Y. C., Hou, J. W., Yu, R. C., Chou, C. C. 2003. Sugars and acid contents in soymilk fermented with lactic acid bacteria alone or simultaneously with *Bifidobacteria*. *Food Microbiology* 20, 333-338.

CAPÍTULO IV – INFLUENCE OF CARRIER AGENTS ON THE SURVIVAL OF *LACTOBACILLUS REUTERI* LR92 AND PHYSICOCHEMICAL PROPERTIES OF FERMENTED JUÇARA EXTRACT POWDER PRODUCED BY SPRAY DRYING³

ABSTRACT

Dehydration by the spray-drying of juçara extract containing *Lactobacillus reuteri* LR92 and the influence of the storage temperature (4, 25 and 37 °C) and the packaging type (BOPP pouches or glass bottles) on the microorganism viability and the physical properties of the powder during 90 days of storage were evaluated. Powders were produced using different carrier agents (maltodextrin, gum acacia and gelatin), and analyses of the cellular viability, moisture content, sorption isotherms, solubility, morphological characteristics and colour were conducted. After dehydration, the *L. reuteri* viability was above 6.0 Log CFU/g for all tested carriers. However, the powders produced with gelatin presented higher survival after drying (8.63 Log CFU/g) and after 90 days of storage at 4 °C in BOPP pouches (7.64 Log CFU/g). The highest yield and solubility were obtained with gum acacia and maltodextrin; these particles presented a spherical and wrinkly surface. Moisture contents below 4% (w/w) were obtained after the spray-drying process, and the experimental data were well-fitted to the GAB (Guggenheim, Anderson, de Boer) model. The package and storage temperature influenced the color parameter.

Keywords: probiotic, *Euterpe edulis*, dehydration, maltodextrin, gum acacia, gelatin.

³ Situação: Será submetido à *Innovative Food Science and Emerging Technology*

Karla Bigetti Guergoletto^{a*}; Marli Busanello^a; Sandra Garcia^a

^a Department of Food Science and Technology; State University of Londrina, Celso Garcia Cid Road, Km 380; C.P.:6001; 86051-970; Londrina, Brazil

*Corresponding author. Tel + 55 43 3371-5966, fax + 55 43 3371-4080; Email address: karla2901@gmail.com

4.1 INTRODUCTION

In recent years, there has been an increasing demand for non-dairy-based food formulations due to problems with lactose intolerance and allergies to dairy products. In this context, formulating and enriching fruit juices with probiotics could provide additional benefits to public health because of added nutrients, such as vitamins and antioxidants, beyond the benefits derived from probiotic bacteria.

Our previous study showed that juçara extract could support the growth of *Lactobacillus plantarum* and *Lactobacillus reuteri* with high microbial viability, even during a storage period (data not published).

The drying process is a preservation technique that has been widely used to dry food and pharmaceuticals; spray-drying is a more economical method compared to lyophilisation and is convenient for utilization in fruit and vegetables juices (Mestry, Mujundar, Thorat, 2011). However, the low molecular weight sugars and organic acids present in fruit juices have low glass transition temperatures and high hygroscopicity, resulting in stickiness, low yield and flowing problems. To prevent these problems, the addition of carrier agents, such as maltodextrin, gum acacia, and gelatin, among others, to the feed solution before the process is often recommended. Therefore, it is possible to produce free-flowing powders, avoid stickiness, reduce powder hygroscopicity, and enhance the process yield; moreover, the carrier agents can also protect sensitive food components, such as vitamins, antioxidants and probiotics, against unfavourable environmental conditions (Bhandari et al., 1997).

Probiotic foods are dried to facilitate storage, handling, transport, stabilization and subsequent use in functional food applications, i.e., in drinks, ice creams, prepared soups and syrups (Pereira et al., 2014). However, drying probiotics is a big challenge that has been receiving attention from scientists because the procedure causes severe losses in probiotic viability. The injuries resulting from drying can be attributed to factors including the breakdown of components such as DNA and RNA (Linders et al, 1997) and the deterioration of the cell membrane (Leslie et al., 1995). Furthermore, these problems may be aggravated during storage due to decreases in the ratio between lipid membrane unsaturated fatty acids and saturated acids, showing damage caused by lipid oxidation. The consequence of biological oxidation is the formation of free radicals that can reduce the hydrophobicity of fatty acids by

hydrophilic groups, weakening the interaction with the hydrophobic membrane proteins (Santivarangkna, Kulozik, Foerst, 2008).

For this reason, different mechanisms have been applied to increase the survival of probiotics during the drying process. In addition to the use of the carrier agents cited above, these approaches include the use of cells in the early-stationary phase that survive better than cells in the mid-log phase during spray-drying and subsequent storage (Corcoran et al., 2004, Santivarangkna et al., 2008); the use of compatible solutes, such as trehalose, betaine and glutamine, in the growth media, which enhances microbial survival after drying (Meng et al., 2007, Santivarangkna et al., 2008); and the use of lower inlet/outlet temperature during the spray-drying process (Desmond et al., 2002, Silva et al., 2011, Anekella, Orsat, 2013), among others.

Because juçara fruit contains approximately 766 mg GAE/100 g of phenolic compounds with high antioxidant activity (Borges et al., 2011), which could help to protect against damage to the cell membrane caused by dehydration, the aim of this study was to evaluate the effects of different carrier agents (maltodextrin, gum acacia and gelatin) on the viability of *L. reuteri* in juçara extract powder produced by spray-drying. The moisture content, colour parameters, sorption isotherms and shape of the powder were determined. The influence of the storage temperature (4 °C, 25 °C and 37 °C) and package (BOPP pouches and glass bottles) on cell viability, solubility, moisture and colour change during 90 days were also analysed.

4.2 MATERIAL AND METHODS

4.2.1 Probiotic Juçara Extract Preparation

Juçara grains were collected during the 2014 harvest from *Euterpe edulis* palm trees produced at the Bimini Farm (Rolândia, Paraná, Brazil) and were kindly provided by Daniel Steidle. To obtain the extracts, the fruits were washed with clean water and were sanitised for 30 min in water containing chlorine at a concentration of 200 mg.kg⁻¹. Then, the grains were rinsed and pulped with clean water (2:1) using a depulper (Macanuda DM-Ji-05, Brazil). The seeds were separated for planting, and the extract was pasteurised in a water bath at 80 °C for 1 min, followed by cooling in an ice bath. This extraction followed the methodology used to produce açai and

juçara pulp in industrial processes (Cohen, Alves, 2006). Immediately prior to use, the extracts were thawed under refrigeration for 18 h and were filtered, first through fabric to remove the sludge and then through a sequence of qualitative filter papers using a Büchner funnel under vacuum to eliminate the solids in suspension, facilitating the product's passage through the nozzle atomizer.

The probiotic juçara extract preparation was performed by fermentation with *Lactobacillus reuteri* (LR Clerici-Sacco, Itália), according to the optimised conditions previously obtained. The conditions were as follows: initial pH 5.7 (adjusted with NaOH), fermentation temperature of 32 °C for 30 h. To improve the survival of *L. reuteri* during drying, 1 mM of betaine and 1 mM of glutamine were added to the juçara extract before the fermentation (Santivarangkna, et al., 2008, Teixeira et al., 2014).

4.2.2 Carriers Agents

The carrier agents used were: maltodextrin (ME) (10DE – Ingredion – Brazil), gum acacia (GA) (Nexira – Brazil) and bovin gelatin (GE) (PB Leiner). Each agent was added to the fermented juçara extract at a concentration of 10% (w/v), at room temperature and aseptic conditions, under magnetic agitation for 10 min for gum acacia and maltodextrin and 20 min for gelatin.

4.2.3 Spray Drying Process

The spray-drying of probiotic juçara extract was performed using a laboratory scale spray-dryer LabPlant SD-05 (Huddersfield, England) with a 0.7 mm diameter nozzle and main chamber of 500 mm x 215 mm. Prior to drying, the spray-dryer was allowed to reach uniform process conditions for 10 min with distilled water. The probiotic juçara extract was kept under magnetic agitation and was fed into the main chamber through a peristaltic pump with a drying air flow of 60 m³ h⁻¹ and compressor air pressure of 0.11 MPa. The feed flow rate was 0.52 L h⁻¹, and the inlet temperatures was 150 ± 1 °C. These conditions were selected in a preliminary study because a low inlet temperature could be used to obtain higher bacterial survival according to previous studies with probiotic spray drying (Desmond et al., 2002; Mestry et al., 2011, Anekella, Orsat, 2013).

4.2.4 Viable Cell Count Determination

Viable cell counts of *L. reuteri* were performed in probiotic juçara extract before and after drying. Samples of 1 g of each spray-dried probiotic juçara extract, or 1 mL for those before drying, were added to 9 mL of 0.1% sterile peptone water (w/v) and kept for 20 min at 37 °C for rehydration (Wang et al., 2004). After this time, decimal dilutions were performed in 0.1% peptone water followed by inoculation in MRS agar (Himedia) with an overlayer and incubation at 37 °C for 72 h under anaerobic conditions (Schwab, Vogel, Gänzle, 2007). The results were recorded as colony-forming units (CFU) per gram in dried probiotic juçara extract or per millilitre before drying.

4.2.5 Physical Properties of Probiotic Powder

4.2.5.1 Powder yield

The powder yield was obtained according to Pereira et al. (2014). Each drying process yield was calculated as a function of the soluble solids in the extract before drying (mass of powder expected) related to the powder collected in the collector flask (mass of powder obtained). The yield was expressed as a percentage (%) according to Eq. 1.

$$\text{Yield (\%)} = (\text{Mass}_{\text{powder obtained}} \times 100) / \text{Mass}_{\text{powder expected}} \quad (\text{Eq. 1})$$

4.2.5.2 Scanning electron microscopy

The spray dried probiotic juçara extracts (SPJ), dehydrated with maltodextrin, gum acacia or gelatin, were assembled on aluminium stubs with carbon tape and covered with gold (Sputter coater, BAL-TEC SCD 050). The images were acquired using a Scanning Electron Microscopy (FEI Quanta 200).

4.2.5.3 Moisture content

Powders moisture contents were determined gravimetrically by drying in a vacuum oven at 70 °C until constant weight (AOAC, 1990).

4.2.5.4 Sorption isotherms

The dried samples were individually placed in a AquaSorp (Decagon Devices, USA) generator operating using the isothermal method for a dynamic dew point. A quantity of 500 to 800 mg of each sample was placed into the compartment. An initial desorption cycle was programmed to reach the minimum water activity at the top of the adsorption test. Adsorption cycle scanning was performed in the range of 0.15 to 0.85 water activity at 25 °C. After adsorption, a new desorption cycle was performed to determine the dry sample weight, which was used in the calculation of the equilibrium moisture content of the samples.

The isotherms were calculated by the GAB model (Guggenheim-Anderson-de-Boer) according to equation 3 using Sorptrack 1:14 software (Decagon Devices, USA).

The isotherms were calculated by model GAB (Guggenheim-Anderson-de-Boer), according to equation 3 using the Sorptrack 1:14 software (Decagon Devices, USA).

$$m = \frac{m_0 \cdot k_b \cdot C_1 \cdot a_a}{[(1 - k_b \cdot a_a) \cdot (1 - k_b \cdot a_a + C_1 \cdot k_b \cdot a_a)]} \quad (\text{Eq. 3})$$

Em que:

m = umidade de equilíbrio do material (% base seca)

a_a = atividade de água

m_0 = umidade na monocamada do material adsorvente (% base seca)

C_1 = constante de Guggenheim

k_b = constante de correção das propriedades das moléculas na multicamada com relação ao volume do líquido.

4.2.5.5 Solubility

Solubility was determined according to the method used by Fazaeli et al. (2012), where 1 g of the material was added to 100 mL of distilled water at room temperature. The mixture was agitated in a 250 mL glass beaker using a magnetic stir bar (IKA) at 800 rpm for 5 min. The solution was placed in a tube and centrifuged at 3,000× g for 5 min. A 25 mL aliquot of the supernatant was then transferred to a pre-weighed Petri dish and immediately oven-dried at 105 °C for 5 h. The solubility (%) was calculated as the weight difference.

4.2.5.6 Colour analysis

The colour of the dried probiotic juçara extract was determined using a Konica Minolta CR400 colorimeter (Tokyo, Japan), and the readings were taken in triplicate. The colorimeter was standardised using illuminant D65, and measurements were made through an 8-mm port/viewing area. The colour measurements were expressed in terms of lightness L^* ($L^* = 0$ for black and $L^* = 100$ for white) and the chromaticity parameters a^* [green (-) to red (+)] and b^* [blue (-) to yellow (+)]. Numerical values from these parameters were converted into the total colour change (ΔE) according to Eq. 2. The reference value was the powder at the beginning of storage (day 0).

$$\Delta E = [(\Delta L^2) + (\Delta a^2) + (\Delta b^2)]^{1/2} \quad (\text{Eq. 2})$$

4.2.6 Storage Evaluation

The influence of three storage temperatures and two types of packaging (glass bottles and BOPP bags) on the dried, encapsulated probiotic stability was studied for 90 days. Thirty grams of each dried probiotic extract was placed in a metallised BOPP bag and hermetically sealed or in small glass bottles with screw caps at 4 °C, 25 °C and 37 °C. Every 15 days, an analysis of the cell viability, colour and moisture was performed. The solubility was determined every 30 days. The storage period analysis was performed in duplicate, and all analyses were performed in triplicate.

4.2.7 Statistical Analysis

Results were presented as mean \pm SD. Tukey test was conducted at 95 % of confidence level using Statistica software version 7.0 (Statsoft, USA).

4.3 RESULTS AND DISCUSSION

4.3.1 Viable Cell Counts of *L. reuteri* in Probiotic Juçara Powder

In this study, the design of the spray-dryer is such that the outlet air temperature cannot be set with a temperature regulator, but these values come from a combination of the inlet temperature, pump setting, and the carrier used. The outlet temperatures were 90 ± 2 °C for gelatin, 80 ± 2 °C for gum acacia and 84 ± 4 °C for maltodextrin.

Table 1 presents the bacterial survival results before and after spray-drying with maltodextrin, gum acacia and gelatin. After the dehydration process (day 0), all samples presented viable cell counts above 6.0 Log CFU/g, which is the minimum recommendation level for probiotics in food products (Gomes, Malcata, 1999; Champagne, Gardner, Roy, 2005) and was adopted as the comparison parameter for this study. Between the carriers, gelatin resulted in the highest survival, followed by gum acacia and maltodextrin. The viability of probiotic microorganisms is the most important parameter for the microbial spray-drying process due to the heat and dehydration exposure, and maximum viability is the major goal for this type of product.

According to Lian, Hsiao, Chou (2002), the survival of microorganisms after spray drying varied with the strain and carrier used. Gum acacia and maltodextrin are polysaccharides, whereas gelatin is a denatured protein. In addition to the differences in the chemical characteristics, these carriers present different physical properties, such as thermal conductivity and thermal diffusivity, which may exert different degrees of protective effects on the cells of the test organism when subjected to heat inactivation during spray-drying, (Lian, Hsiao, Chou, 2002). Furthermore, proteins can delay the crystallisation of carbohydrates present in juçara extract, maintaining the glassy state, which is protective in dried cells (Poddar et al., 2014).

Table 1. Viable cell counts of *L. reuteri* (Log CFU per gram) in the spray-dried probiotic juçara extract, packaged in BOPP pouches and glass bottles, during storage at refrigerated (4 °C) and ambient temperature (25 °C) using different carriers.

Samples (Log UFC/g)						
BOPP						
Storage (days)	M 4°C§	G4 °C§	Gel4 °C*§	M 25°C§	G25 °C§	Gel25 °C§
Before drying	8.88±0.11 ^a	8.87±0.13 ^a	8.85±0.16 ^a	8.88±0.11 ^a	8.87±0.13 ^a	8.85±0.16 ^a
0	6.53±0.15 ^{b,c}	7.35±0.13 ^b	8.63±0.11 ^b	6.53±0.15 ^b	7.35±0.13 ^b	8.43±0.11 ^b
15	6.44±0.09 ^b	6.97±0.15 ^{b,c}	8.59±0.19 ^b	5.91±0.12 ^c	6.21±0.22 ^c	7.38±0.15 ^c
30	6.08±0.10 ^{c,d}	6.71±0.26 ^{b,c}	8.48±0.17 ^b	5.48±0.09 ^d	4.02±0.11 ^d	2.65±0.10 ^d
45	5.80±0.32 ^d	6.40±0.37 ^c	8.51±0.21 ^b	-	2.57±0.24 ^e	-
60	5.65±0.14 ^d	5.47±0.25 ^d	8.39±0.09 ^{b,c}	-	-	-
75	4.90±0.05 ^e	4.88±0.23 ^{d,e}	8.41±0.20 ^{b,c}	-	-	-
90	3.93±0.21 ^f	4.48±0.18 ^e	7.94±0.36 ^c	-	-	-
Glass						
Storage (days)	M 4°C§	G4 °C§	Gel4 °C*§	M 25°C§	G25 °C§	Gel25 °C§
Before drying	8.88±0.11 ^a	8.87±0.13 ^a	8.85±0.16 ^a	8.88±0.11 ^a	8.87±0.13 ^a	8.85±0.16 ^a
0	6.53±0.15 ^b	7.35±0.14 ^b	8.43±0.11 ^b	6.53±0.15 ^b	7.35±0.14 ^b	8.43±0.11 ^b
15	6.20±0.09 ^b	6.73±0.07 ^c	7.54±0.15 ^c	5.84±0.19 ^c	5.50±0.06 ^c	7.45±0.02 ^c
30	5.98±0.09 ^{b,c}	6.13±0.09 ^d	6.97±0.10 ^d	5.18±0.19 ^d	3.41±0.13 ^d	-
45	5.81±0.12 ^c	5.88±0.06 ^d	6.95±0.13 ^d	2.38±0.21 ^e	2.71±0.23 ^e	-
60	5.34±0.11 ^d	5.21±0.13 ^e	6.84±0.07 ^d	-	2.00±0.03 ^f	-
75	3.86±0.20 ^e	5.01±0.15 ^e	6.69±0.05 ^{d,e}	-	-	-
90	2.91±0.07 ^f	4.65±0.20 ^f	6.50±0.12 ^e	-	-	-

ME = maltodextrin; GA = gum Acacia; GE = gelatin

* Samples significant different between the packages used ($p < 0.05$) for the same substrate and same incubation temperature

§ Samples significant different between the incubation temperature ($p < 0.05$) for the same substrate and package

Different letters in the same column are statistically different according to Tukey test carried out at 95 % of confidence level.

-: No viable cell

There are no commercial lactic acid cultures available that are stable at elevate temperatures (> 70 °C) (Peighambardoust et al., 2011), and different species have been studied for their ability to survive the spray-drying process (Lian et al., 2002; Mestry et al., 2011; Pereira et al., 2014). However, only one study reported the survival of *L. reuteri* during the dehydration process using whey as the carrier (Jantzen, Göpel, Beermann, 2013).

In the dehydration process, the removal of water from bacterial cells can impose physiological problems to cell components and cause a rupture of the cell membrane. Moreover, during the drying process in which cells come into contact with

a large volume of air, like spray-drying, membrane lipid oxidation can also result in physical changes. Apart from dehydration inactivation, in processes that use temperature, such as spray-drying, the inactivation of cells can increase depending on the drying parameters, i.e., the inlet/outlet air temperatures, the residence time and the feed rate. The temperature at which the product leaves the drying chamber is believed to be the major parameter that affects microbial survival because the heat can inactivate critical components (Santivarangkna et al., 2008/b).

Although many authors have reported that outlet temperatures above 85 °C are lethal to probiotic survival (Gardiner et al., 2000; Anekella, Orsat, 2013), our study demonstrated that other factors may exert a protective effect. Silvia et al. (2005) demonstrated that cells grown in a non-controlled pH environment confer an additional resistance during the heat and drying processes because the acid stress can produce proteins for cell adaptation to other various stress conditions, which was similarly done for probiotic juçara extract. Moreover, the phenolic compounds with high antioxidant activity present in juçara extract combined with compatible solutes could cause a lowered death rate during dehydration. Previous studies demonstrated the effect of antioxidants for preserving cells upon dehydration damage (Teixeira et al., 1995). Additionally, the addition of compatible solutes, such as glutamate and betaine, to the growth media can equip the cells for the hyperosmotic stress that occurs during a drying process (Santivarangkna et al., 2008).

A way to reduce the outlet temperature would be to decrease the inlet temperature and air pressure; however, it was observed in preliminary tests that changes in these drying parameters resulted in incomplete juçara extract drying. Furthermore, previous studies reported that changes in these parameters could increase the final product moisture, causing problems in product storage (Gardiner et al. 2000).

Bacterial survival after the dehydration process is a challenge not only for spray-drying probiotic products but also for the viability during long storage periods. In the present study, during the storage period (Table 1), the temperature had the strongest significant effect ($p < 0.05$) on bacterial survival, followed by the carrier agent, the time period and the packaging type. At 15 days of storage, no viable cells were found for all samples stored at 37 °C (data not shown); therefore, all analyses at this temperature were terminated.

Samples dried with GE maintained the highest survival when stored at 4 °C and presented counts above 6 Log CFU/g, even after 90 days of storage for both packaging. For gum acacia and maltodextrin samples, at the lowest temperature adopted, viability was maintained until 45 and 30 days, respectively for BOPP pouches and 30 and 15 days for glass bottles. The microbial stability followed the descending order of gelatin > gum acacia > maltodextrin.

This behaviour was not observed for samples stored at 25 °C, and although some viable cells exist for up to 60 days of storage for acacia gum in glass bottle, the count numbers are considered too low for probiotic products. Lower bacterial survival in powder storage at room temperature (25 °C) was reported by several authors (Wang et al., 2004; Kearney et al., 2009). Pereira et al., (2014) evaluating probiotic cashew apple powders, obtained the highest *L. casei* viability at 4 °C storage and demonstrated a survival of 70 % until 21 days of storage at room temperature (25 °C). However, the results and the time analysed were lower than the values found in the present study.

The packaging used exerted a small influence on the bacterial survival for maltodextrin and gum acacia and a significant ($p \leq 0.05$) influence on the gelatin samples at 4 °C, and the survival was higher in the BOPP pouch than in the glass bottle. These results were also reported by Wang et al., (2004), who found better *Bifidobacterium longum* and *Streptococcus thermophilus* survival in dried fermented soymilk when it was stored in a laminated pouch than when stored in a glass or PET bottle.

Damage during storage of LAB is also associated with changes in the fatty acid profile of the membrane, for which lipid oxidation is an important cause. Studies have shown that vacuum storage provides better cell viability than without vacuum. Although the use of antioxidants can protect cells during the drying process, the use of oxygen-scavenging agents during the storage period does not have a significant effect in protecting cell viability (Fu, Chen, 2011), and some antioxidants, such as ascorbic acid, can act as a pro-oxidants, generating hydroxyl radicals that can oxidise biological molecules (Santivarangkna et al., 2008/b).

4.3.2 Physical Properties of Spray Dried Probiotic Juçara Extract

4.3.2.1 Powder yield

The yield of the spray-dried products can be influenced by different parameters, including the inlet temperature, feed flow rate and carrier agent concentration (Tonon et al., 2008). In the present study, the spray-dried probiotic juçara extract yield was compared in relation to the different carrier agents. The powders obtained with gum acacia had the highest yield with $63 \pm 3.0\%$, followed by maltodextrin with $57 \pm 3.2\%$ and gelatin at $24 \pm 4.0\%$.

These results are in agreement with Arslan et al. (2015), who obtained the highest yield with gum acacia and the lowest yield with gelatin for six different types of wall materials used to microencapsulate *Saccharomyces cerevisiae* var *boulardii* by spray-drying. Rajabi et al. (2015) obtained the highest yield with maltodextrin, followed by gum acacia and gelatin when encapsulating saffron bioactive components by spray-drying. The differences between the studies can be attributed to the higher solids content and different type of maltodextrin used in the saffron research.

The low yield obtained for gelatin is due to its high viscosity, which increases the feed viscosity, causing solids to stick to the main chamber wall and reducing the process yield (Tonon et al., 2008).

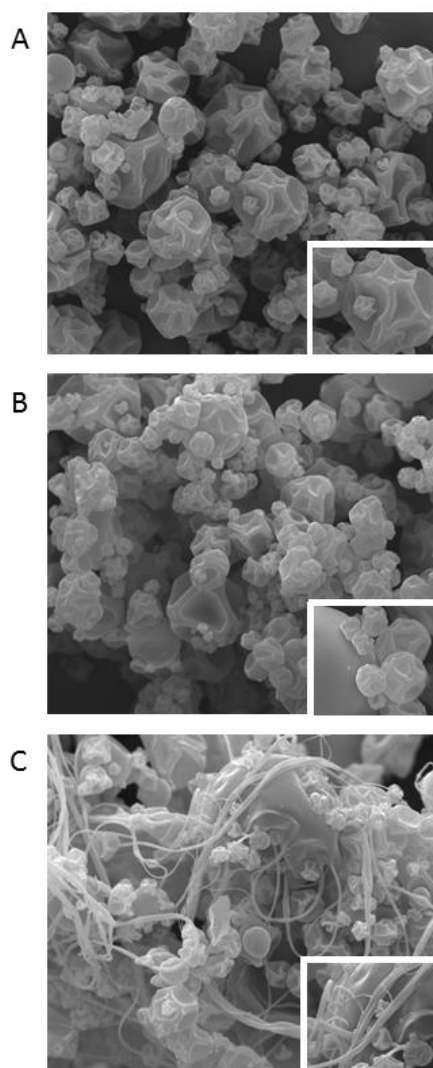
4.3.2.2 Scanning electron microscopy

The morphological characteristics of the spray-dried probiotic juçara powders produced using different carrier agents are presented in Fig. 1. The maltodextrin and gum acacia particles had spherical shapes and various sizes, with a wrinkly surface (Fig. 2 A and B). For gelatin, there were long filaments between the spheres (Fig. 2 C) that originated from gelatin denaturation at high drying temperature (Bozec et al., 2011).

No bacterial cells were seen in the micrographs because the cells were entrapped inside the capsules, which protected them against damage caused by the heat and the drying process (Rajabi et al., 2015).

The main causes of the appearance of depressions in the powder surfaces are the high temperature in the drying chamber and the atomized droplets size, which lead to a rapid withdrawal of water, resulting in a wrinkled shape (Rajabi et al., 2015).

Figure 1. Scanning electron micrographs of spray-dried probiotic juçara extract produced using different carrier agents. (A) maltodextrin, (B) gum acacia, (C) gelatin. Magnification: 3000x; inset magnification: 12000x



4.3.2.3. Moisture content and sorption isotherms

The moisture content, which is related to the drying efficiency, is an important property for dehydrated products; furthermore, higher values affect the technological, microbial and physical properties of powder products (Tan et al., 2011).

The moisture content of probiotic juçara powders varied from 2.7% to 4 % (Fig. 2), depending on the carrier agent used. After drying, maltodextrin showed a

significantly lower moisture content ($p \leq 0.05$) compared to gum acacia and gelatin, and this behaviour was due to the differences between the chemical structures of the carrier agents. However, all samples presented an increase in moisture content during storage (Fig. 2), with the highest increase for gum acacia in the samples stored at 4 °C, and for maltodextrin and gelatin stored at 25 °C.

Gardiner et al., (2000) suggested a moisture content of approximately 4% to maintain probiotic viability during the storage period. However, for many years, water activity has been considered more important than the total amount of water to establish the quality and stability of foodstuff. Sorption isotherms are important thermodynamic tools for predicting the interactions between water and food components and describe the relationship between water activity and the moisture content of a food product (Tonon et al., 2009).

Fig. 3. Shows the experimental sorption isotherms for the spray-dried probiotic juçara powder produced using different carrier agents fitted to the GAB model. The estimated parameters are presented in Table 2.

According to Fig. 3, the powder produced with maltodextrin had the lowest water adsorption, followed by the powder produced with gelatin, whereas the samples produced with gum acacia were the most hygroscopic. A similar trend was observed by Benedetti et al. (2011), Ferrari et al. (2012) and Tonon et al. (2009); this trend is attributed to the ramified structure of gum acacia, which promotes greater moisture adsorption (Ferrari et al., 2012).

The GAB model showed a good fit to the experimental data (Table 2), with high R^2 values, and was used to represent the sorption data of probiotic juçara powder. The BET and GAB models are based on the monolayer moisture concept and provide the value of the monolayer moisture content of the material (m_0), considered as the safe moisture for dried foods during preservation. According to Labuza (1975), this water can be thought of as being in a state in which it is unavailable as a solvent for reactions to occur, and for this reason, it is considered an important value to assure food stability. The m_0 obtained for the spray-dried probiotic juçara extract varied from 6.5 % to 7.2 %. These results are slightly higher than the ones found by Tonon et al., (2009), who obtained a monolayer of 5 % for maltodextrin 10 DE and 5.3 % for gum acacia for spray-dried açai juice, and the results are lower than Ferrari et al. (2012), who showed values of 7.1 % for maltodextrin and 8.7 for gum acacia. However, their isotherm was built in a static

desiccator, and in this study, a dynamic method was used. Additionally, the values are also considered low and recommended for dried products (Ferrari et al, 2012).

Figure 2. Moisture content (%) of spray-dried probiotic juçara extract with (A) maltodextrin, (B) gum acacia and (C) gelatin during storage at refrigerated (4 °C) and ambient temperature (25 °C), packaged in BOPP pouches and glass bottles for 90 days.

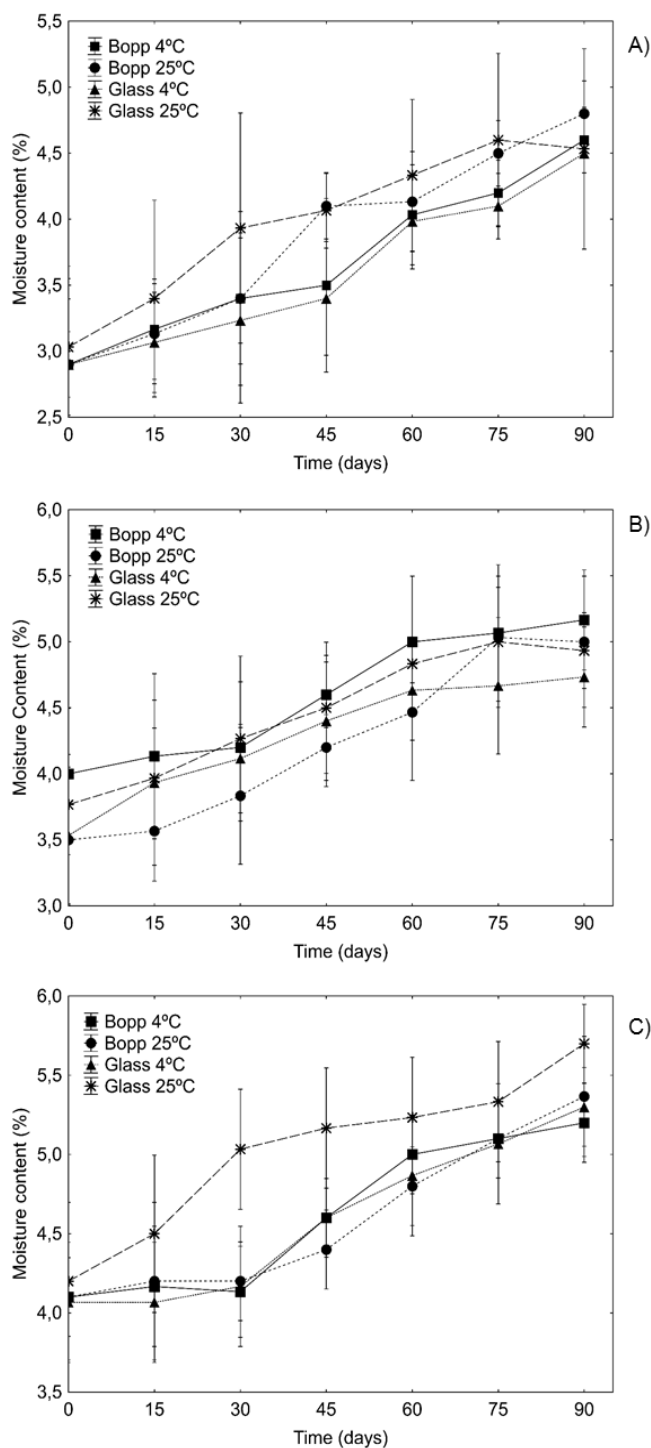
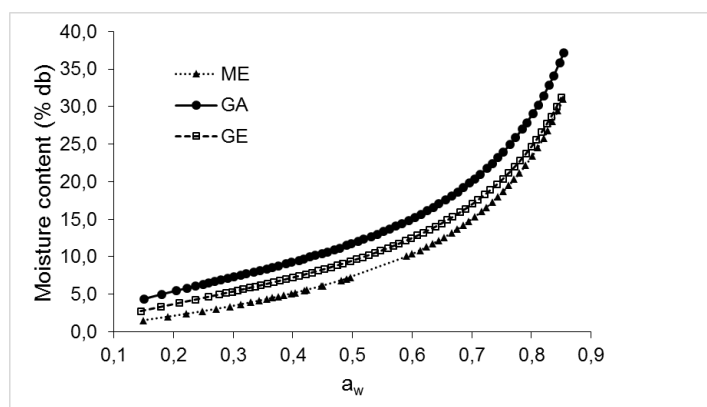


Figure 3. Sorption isotherms of spray-dried probiotic juçara extract produced with maltodextrin (▲), gum acacia (●) and gelatin (□).



Although the moisture content increased during the storage period, it was lower than the m_0 values obtained for each carrier. Therefore, a storage period of 90 days and both types of packaging could assure the product technological properties. However, the viability of bacteria during storage is dependent on the moisture content because at higher humidity, water begins to act as a plasticiser of the protective agents and increases the molecular mobility, which results in crystallisation of the amorphous state and loss of bacterial viability during storage (Poddar et al., 2014). This effect is strongly dependent on the glass transition temperature (T_g), and above the T_g , an increase in molecular mobility can occur (Santivaragkna et al., 2008/b). Because small differences in moisture content can lead to greater bacterial viability loss (Poddar et al., 2014), additional studies evaluating the glass transition temperature (T_g) for each carrier agent to determine the critical water activity for the maintenance of *L. reuteri* in juçara extract powder during storage period are suggested.

Table 2. Estimated GAB* parameters for probiotic juçara extract powder produced with maltodextrin, gum acacia and gelatin.

Parameters	Carrier agents**		
	Gum acacia (GA)	Maltodextrin (ME)	Gelatin (GE)
m_0	7.2038	6.6979	6.5745
C_1	6.534	1.466	3.5587
K_1	0.9519	0.9537	0.9446
R^2	0.999	0.996	0.998

* GAB: Guggenheim-Anderson-de-Boer

** GA, ME and GE were added at 10% (w/w)

4.3.2.4 Solubility

Table 3 shows the solubility of probiotic juçara powder with maltodextrin, gum acacia and gelatin after the dehydration process and during storage for 90 days with different temperatures and packaging. Solubility varied with the carrier used and was significantly ($p \leq 0.05$) affected by storage time. Probiotic maltodextrin powder and gum acacia had a high degree of solubility, reaching values above 90 % during the first 30 days of storage, whereas probiotic gelatin had very low solubility.

The storage temperature did not significantly ($p > 0.05$) affect the solubility parameter, and the type of package used influenced only the gelatin samples stored at 25 °C.

Maltodextrin and gum acacia are widely used as carriers in spray-drying processes due to their physical properties, such as their high solubility in water. Instant powder solubility is directly related to particle microstructure, and it was possible to note by electron microscopy (Fig. 1) that carbohydrates presented amorphous surfaces, whereas gelatin presented a filamentary appearance. Previous literature indicated that a higher degree of amorphous surface increased the solubility of the powder in the water. The lowest solubility for gelatin may be due to two factors: first, the gelatin had low solubility at temperatures below 50 °C, and second, the gelatin had long filaments in the material, which may decrease the solubility (Cano-Chauca et al., 2005).

The solubility parameter is also related to the inlet air temperature and the moisture content. High inlet temperatures produce a hard surface layer, decreasing the solubility, whereas low moisture content is associated with a faster hydration (Goula et al., 2004; Cano-Chauca et al., 2005).

4.3.2.5 Colour analysis

After the dehydration process, the powder colours were evaluated based on the colour components (L^* , a^* , b^*), and the results are shown in Table 4. The lightness values (L^*) were significantly lower ($P \leq 0.05$) for the samples produced with gum acacia, indicating that these powders were slightly darker. The parameters a^* and b^* did not show significant differences between maltodextrin and gum acacia, but both were different from gelatin. According to Nadeem et al. (2011), the

differences in the lightness component between gum acacia and maltodextrin are related to their original colour because maltodextrin is white and gum acacia is a beige powder.

Table 3. Solubility (%) of spray-dried probiotic juçara extract, packaged in BOPP pouches and glass bottles, during storage at refrigerated (4 °C) and ambient temperature (25 °C) for 90 days.

Solubility (%)						
BOPP						
Storage days	ME 4°C	GA4 °C	GE4 °C	ME 25°C	GA25 °C	GE25 °C *
0	92.46±0.44 ^a	91.25±0.24 ^a	56.24±0.31 ^a	92.87±0.41 ^a	91.38±0.47 ^a	56.17±0.31 ^a
30	91.72±0.31 ^a	86.74±0.25 ^b	31.40±0.46 ^b	92.34±0.31 ^a	88.71±0.28 ^b	40.43±0.49 ^b
60	83.26±0.25 ^b	86.93±0.26 ^b	27.82±0.23 ^c	89.59±0.23 ^b	85.99±0.42 ^c	27.52±0.56 ^c
90	80.93±0.40 ^c	80.89±0.11 ^c	17.57±0.21 ^d	86.46±0.41 ^c	81.70±0.33 ^d	17.54±0.32 ^d
Glass						
Storage days	ME 4°C	GA4 °C	GE4 °C	ME 25°C	GA25 °C	GE25 °C *
0	92.46±0.44 ^a	91.26±0.24 ^a	56.57±0.28 ^a	92.46±0.39 ^a	91.38±0.47 ^a	56.23±0.28 ^a
30	91.44±0.38 ^a	90.17±0.13 ^b	51.55±0.44 ^b	91.41±0.43 ^b	89.52±0.43 ^b	50.81±0.97 ^b
60	87.74±0.29 ^b	88.73±0.34 ^c	41.29±0.28 ^c	88.77±0.21 ^c	84.43±0.46 ^c	47.87±0.82 ^c
90	86.43±0.43 ^b	84.66±0.31 ^d	37.45±0.63 ^d	86.82±0.22 ^d	83.86±0.23 ^c	38.01±0.99 ^d

ME = maltodextrin; GA = gum Acacia; GE = gelatin

* Samples significant different between the packages used ($p \leq 0.05$) for the same substrate and same incubation temperature

Different letters in the same column for the same package are statistically different according to Tukey test carried out at 95 % of confidence level.

Table 4. Color parameters of spray-dried probiotic juçara extract produced with maltodextrin, gum acacia and gelatin as carriers.

Sample	L^*	a^*	b^*
Maltodextrin	10.37±0,15 ^a	11±0.02 ^a	5.2±0,10 ^a
Gum arabic	9.65±0.12 ^b	10.5±0,11 ^a	5,1±0.15 ^a
Gelatin	12.34±0,22 ^c	5.75±0,16 ^b	3.6±0.12 ^b

Different letters in the same column are statistically different according to Tukey test carried out at 95 % of confidence level.

L^* : $L^* = 0$ for black and $L^* = 100$ for white; a^* : [green (-) to red (+)]; b^* : [(blue (-) to yellow (+))]

During the 90 days of storage with different packaging and temperature, the changes in the colour parameter (ΔE^*) (reference value was the first day of storage – day 0) were also evaluated (Table 5), and only gum acacia stored at 4 °C with BOPP did not have a significant colour change during storage. In addition to the storage

time, the package and the storage temperature also influenced the product colour, with the highest differences at 25 °C in glass bottles.

Table 5. Instrumental color difference (ΔE^*) for the spray-dried probiotic juçara extract, packaged in BOPP pouches and glass bottles, during storage at refrigerated (4 °C) and ambient temperature (25 °C) for 90 days. The results are presented as color difference in relation to time 0 days.

ΔE^*						
BOPP						
Storage (days)	M 4°C *§	G 4°C *§	Gel 4°C *§	M 25°C *§	G 25°C §	Gel 25°C *§
15	0.68±0.24 ^{a,b}	0.89±0.01 ^a	0.02±0.00 ^a	0.81±0.21 ^a	0.62±0.01 ^a	0.72±0.03 ^a
30	0.58±0.01 ^a	0.93±0.01 ^a	0.09±0.00 ^b	1.93±0.01 ^b	1.02±0.03 ^b	0.81±0.00 ^{a,b}
45	0.93±0.01 ^{b,c}	0.95±0.13 ^a	0.15±0.02 ^c	2.09±0.01 ^{b,c}	1.19±0.01 ^c	0.81±0.02 ^{a,b}
60	1.18±0.00 ^{c,d}	1.01±0.01 ^a	0.24±0.00 ^d	2.18±0.00 ^c	1.62±0.01 ^d	0.93±0.08 ^{b,c}
75	1.30±0.01 ^d	1.04±0.01 ^a	0.25±0.01 ^e	2.29±0.01 ^d	1.52±0.03 ^e	0.93±0.08 ^{b,c}
90	1.54±0.04 ^e	1.05±0.01 ^a	0.30±0.02 ^f	2.43±0.02 ^e	1.55±0.01 ^e	0.99±0.06 ^c
Glass						
Storage (days)	M 4°C *§	G 4°C *§	Gel 4°C *§	M 25°C *§	G 25°C §	Gel 25°C *§
15	0.76±0.08 ^a	1.01±0.07 ^a	0.34±0.04 ^a	0.64±0.02 ^a	0.22±0.00 ^a	0.46±0.00 ^a
30	1.11±0.03 ^b	1.34±0.01 ^a	0.46±0.01 ^b	1.29±0.03 ^b	0.62±0.01 ^b	0.92±0.00 ^b
45	1.13±0.03 ^b	1.36±0.06 ^b	0.54±0.01 ^c	1.42±0.03 ^{b,c}	0.85±0.08 ^c	1.08±0.02 ^c
60	1.23±0.04 ^b	1.43±0.16 ^{b,c}	0.62±0.01 ^d	1.44±0.03 ^c	1.32±0.00 ^d	2.11±0.00 ^d
75	1.62±0.04 ^c	1.53±0.19 ^{b,c}	0.65±0.01 ^d	1.43±0.03 ^d	1.56±0.01 ^e	2.18±0.01 ^e
90	2.01±0.14 ^c	1.67±0.01 ^c	1.41±0.01 ^e	1.19±0.05 ^e	1.93±0.01 ^f	2.22±0.00 ^f

* Samples significant different between the packages used ($p < 0.05$) for the same substrate and same incubation temperature, alongside the storage time

§ Samples significant different between the same incubation temperature ($p < 0.05$) for the same substrate and package, alongside the storage time

Different letters in the same column are statistically different according to Tukey test carried out at 95 % of confidence level.

Although the products were stored in the dark, the light barrier of the BOPP pouches was more efficient than that of the glass bottles, demonstrating the importance of metallic packaging for powder products (Wang et al., 2004).

Juçara berries are a rich source of phenolic compounds, mainly anthocyanins (Borges et al., 2011), and higher storage temperature can accelerate the degradation in spray-dried product (Fang, Bhandari, 2011),

However, according to Pereira et al., (2014), the human eye is only able to perceive colour differences when $\Delta E^* > 3$, and all differences were below this value.

4.4 CONCLUSION

The spray-dried probiotic juçara extract showed levels of *L. reuteri* viable cells above 6.5 Log UFC/g, however, gelatin was the best carrier because it had the highest number of viable cells after spray-drying and after storage at 4 °C with BOPP pouches.

The powders produced with maltodextrin and gum acacia had the highest solubility and spherical shapes with various sizes, whereas gelatin had long filaments between the spheres.

The water adsorption experimental data were well-fitted to the GAB model with high coefficients of determination. After spray-drying, all samples presented a water content below 4%; however, a slight increase was observed during the storage period. The package and storage temperature influenced the colour parameter, but this difference compared to the first day of storage was not noticeable by the human eye.

This study showed that gelatin can be used to produce spray-dried probiotic products; however, the improvement of the powder shelf-life at ambient temperature and better yield and solubility parameters are necessary to obtain probiotic powders with adequate physical properties.

4.5 REFERENCES

- Ananta, E., Volkert, M., & Knorr, D. (2005). Cellular injuries and storage stability of spray-dried *Lactobacillus rhamnosus* GG. *International Dairy Journal*, 15, 399-409.
- Anekella, K., Orsat, V. (2013). Optimization of microencapsulation of probiotics in raspberry juice by spray drying. *LWT - Food Science and Technology*, 50, 17-24.
- Arslan, S., Erbas, M., Tontul, I., Topuz, A. (2015). Microencapsulation of probiotic *Saccharomyces cerevisiae* var. *boulardii* with different wall materials by spray drying. *LWT – Food Science and Technology*, 63, 685-690.
- Benedetti, P. C. D., Pedro, M. A. M., Telis-Romero, J., Telis, V. R. N. (2011). Influence of encapsulating materials on water sorption isotherms of vacuum-dried persimmon pulp powder. *Journal of Food Processing and Preservation*, 35 (4), 423-431.
- Borges, G. S. da, Vieira, F. G., Copetti, C., Gonzaga, L. V., Zambiasi, R. C., Mancini Filho, J., Fett, R. (2011). Chemical characterization, bioactive compounds, and

antioxidant capacity of jussara (*Euterpe edulis*) fruit from the Atlantic Forest in southern Brazil. *Food Research International*, 44, 2128-2133.

Bozec, L., Odlyha, M. (2011). Thermal denaturation studies of collagen by microthermal analysis and atomic force microscopy. *Biophysics Journal*, 101 (1), 228-236.

Cano-Chauca, M., Stringheta, P. C., Ramos, A. M., Cal-Vidal, J. (2005). Effect of the carriers on the microstructure of mango powder obtained by spray drying and its functional characterization. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 6, 420-428.

Champagne, C. P., Gardner, N. J., Roy, D. (2005). Challenges in the addition of probiotic cultures to foods. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 45, 61-84.

Cohen, K. O. de, Alves, S. M. de (2006). *Sistemas de Produção do Açaí*. Embrapa Amazonia Oriental – Sistemas de Produção, 4.

Corcoran, B. M., Ross, R. P.; Fitzgerald, G. F., Stanton, C. (2004). Comparative survival of probiotic lactobacilli spray-dried in the presence of prebiotic substances. *Journal of Applied Microbiology*, 96, 1024-1039, 2004.

Desmond, C., Ross, R. P., O'Callaghan, E., Fitzgerald, G., Stanton, C. (2002). Improved survival of *Lactobacillus paracasei* NFBC 338 in spray-dried powders containing gum acacia. *Journal of Applied Microbiology*, 93, 1003-1011.

Fang, Z., Bhandari, B. (2011). Effect of spray drying and storage on the stability of bayberry polyphenols. *Food Chemistry*, 129, 1139-1147.

Fu, N., Chen, X. D. (2011). Towards a maximal cell survival in convective thermal drying processes. *Food Research International*, 44, 1127-1149.

Gardiner, G. E., O'Sullivan, E., Kelly, J., Auty, M. A. E., Fitzgerald, G. F., Collins, J. K. (2000). Comparative survival rates of human-derived probiotic *Lactobacillus paracasei* and *L. salivarius* strains during heat treatment and spray drying. *Applied and Environmental Microbiology*, 66, 2605-2612.

Gomes, A. M. P.; Malcata, F. X. *Bifidobacterium* spp. and *Lactobacillus acidophilus*: biological, biochemical, technological and therapeutical properties relevant for use as probiotics. *Trend in food science and technology*, v. 10, p. 139-157, 1999.

Goula, A. M., Adamopoulos, K. G., Kazakis, N. A. (2004). Influence of spray drying conditions on tomato powder properties. *Drying Technology*, 22 (5), 1129-1151.

Jantzen, M., Göpel, A., Beermann, C. (2013). Direct spray drying and microencapsulation of probiotic *Lactobacillus reuteri* from slurry fermentation with whey. *Journal of Applied Microbiology*, 115, 1029-1036.

Krasaekoopt, W., Bhandari, B., Deeth, H. (2004). The influence of coating materials on some properties of alginate beads and survivability of microencapsulated probiotic bacteria. *International Dairy Journal*, 14 (8), 737-743.

Labuza, T. P (1975). Interpretation of sorption data in relation to the state of constituent water. In: Duckworth, R. B. (Ed.), Water relations of foods (pp.155-171). London: Academic Press Inc. Ltd.

Lian, W. C., Hsiao, H. C., Chou, C. C. (2002). Survival of bifidobacteria after spray-drying. *International Journal of Food Microbiology*, 74, 79-86.

Mestry, A. P., Mujumdar, A. S., Thorat, B. N. (2011). Optimization of spray drying of an innovative functional food: fermented mixed juice of carrot and watermelon. *Drying Technology*, 29, 1121-1131.

Nadeem, H. S., Torun, M., Ozdemir, F. (2011). Spray drying of the mountain tea (*Sideritis stricta*) water extract by using different hydrocolloid carriers. *LWT – Food Science and Technology*, 44, 1626-1635.

Pereira, A. L. F., Almeida, F. D. L., Lima, M. A., Costa, J. M. C., Rodrigues, S. (2014). Spray-drying of probiotic cashew apple juice. *Food Bioprocess Technology*, 7, 2492-2499.

Poddar, D., Das, S., Jones, G., Palmer, J., Jameson, G. B., Haverkamp, R. G., Singh, H. (2014). Stability of probiotic *Lactobacillus paracasei* during storage as affected by the drying method. *International Dairy Journal*, 39, 1-7.

Rajabi, H., Ghorbani, M., Jafari, S. M. Jafari, Mahoonak, A. S., Rajabzadeh, G. (2015). Retention of saffron bioactive components by spray drying encapsulation using maltodextrin, gum Arabic and gelatin as wall materials. *Food Hydrocolloids*, 51, 327-337.

Santivarangka, C., Kulozik, U., Foerst, P. (2008/a). Protection mechanisms of sugars during different stages of preparation process of dried lactic acid starter cultures. *Food microbiology*, 25, 429-441.

Santivarangka, C., Kulozik, U., Foerst, P. (2008/b). Inactivation mechanisms of lactic acid starter cultures preserved by drying processes. *Journal of Applied Microbiology*, 105, 1-13.

Silva, J., Carvalho, A. S., Ferreira, R., Vitorino, R., Amado, F., Domingues, P., Teixeira, P., Gibbs, P. A. (2005). Effect of the pH of growth on the survival of *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* to stress conditions during spray-drying. *Journal of Applied Microbiology*, 98, 775-782.

Schwab, C., Vogel, R., Gänzle, M. G. (2007). Influence of oligosaccharides on the viability and membrane properties of *Lactobacillus reuteri* TMW1.106 during freeze-drying. *Cryobiology*, 55, 108-114.

Tan, L. W., Ibrahim, M. N., Kamil, R., Taip, F. S. (2011). Empirical modeling for spray drying process of stick and non-stick products. *Procedia Food Science 1*, The 11th International Congress on Engineering and Food, 690-697.

Tonon, R. V., Brabet, C., Hubinger, M. D. (2008). Influence of process conditions on the physicochemical properties of acai (*Euterpe oleracea* Mart.) powder produced by spray drying. *Journal of Food Engineering*, 88, 411-418.

Tonon, R. V., Baroni, A. F., Brabet, C., Gilbert, O., Pallet, D., Hubinger, M. (2009). Water sorption and glass transition temperature of spray dried acai (*Euterpe oleracea* Mart.) juice. *Journal of Food Engineering*, 94, 215-221.

Teixeira, J. S., Seeras, A., Sanchez-Maldonado, A. F., Zhang, C., Su, M. S., Ganzle, M. G. (2014). Glutamine, glutamate and arginine-based resistance in *Lactobacillus reuteri*. *Food Microbiology*, 42, 172-180.

Wang, Y. C., Yu, R. C., Chou, C. C. (2004). Viability of lactic acid bacteria and bifidobacteria in fermented soymilk after drying, subsequent rehydration and storage. *International Journal of Food Microbiology*, 93, 209-217.

CAPÍTULO V – INFLUÊNCIA DA DESIDRATAÇÃO POR SPRAY DRYER NA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DE EXTRATO DE JUÇARA PROBIÓTICO E NA FORMAÇÃO DE RADICAIS LIVRES DETECTADOS POR RPE⁴

RESUMO

O objetivo deste trabalho foi avaliar a atividade antioxidante de juçara fermentada com probióticos e desidratada por spray-drying, bem como verificar a formação de radicais livres após armazenamento em temperatura ambiente de 25 °C. O extrato fermentado por *L. reuteri* apresentou conteúdo de compostos fenólicos entre 648,2 a 1468,9 mg EAG/100g e, 113,63 a 250,5 µM trolox/mL de atividade antioxidante, que foram significativamente ($p < 0,05$) maiores do que o extrato fermentado com *L. plantarum* (738,87 a 1345,3 mg EAG/100g e 114 a 165,92 µM trolox/mL, respectivamente). A amostra de juçara fermentada com *L. reuteri* e goma acácia apresentou a maior inibição de espécies reativas de oxigênio (EROs) produzidos por neutrófilos. Os processos, fermentativo e atomização, não produziram aumento na intensidade e nos tipos dos radicais observados pela técnica de RPE logo após a secagem, entretanto o armazenamento à 25 °C e sem vácuo ocasionou uma diminuição no poder antioxidante e um aumento no número de radicais produzidos em todas as amostras.

Palavras-chave: *L. reuteri*, *L. plantarum*, compostos fenólicos, *burst* de neutrófilos, ressonância paramagnética, secagem.

⁴ Karla Bigetti Guergoletto^{a*}; Kamila Landucci Bonifácio^b, Décio Sabbatini Barbosa^b, Daniel Farinha Valezi^c, Aroldo Salviato^c, Eduardo Di Mauro^c, Elza Louko Ida^a; Sandra Garcia^a.

^a Departamento de Ciência e Tecnologia de Alimentos; Universidade Estadual de Londrina, Rodovia Celso Garcia Cid, Km 380; C.P.: 6001; 86051-970; Londrina – PR, Telefone: + 55 43 3371-4080 *email: karla2901@gmail.com, sgarcia@uel.br, phone number: + 55 43 3371-5966

^b Departamento de Patologia, Análises Clínicas e Toxicológicas; Universidade Estadual de Londrina

^c Departamento de Física; Universidade Estadual de Londrina

5.1 INTRODUÇÃO

A etiologia de muitas doenças crônicas como Parkinson, Alzheimer e câncer, está associada a um desequilíbrio no sistema redox celular e um aumento nos níveis de espécies reativas de oxigênio (EROs) e de nitrogênio (ERN) (Deiana et al., 2010).

Quando devidamente estimulados, os neutrófilos produzem essas espécies a partir do sistema NADPH-oxidase e, embora sejam necessárias para o mecanismo de defesa, os radicais livres produzidos em excesso podem interagir e lesar diversas estruturas celulares, induzindo à peroxidação lipídica e à aceleração da apoptose.

A concentração de EROs e ERNs e a limitação da peroxidação lipídica são mantidas por meio de defesas antioxidantes que interrompem a cadeia de peroxidação, removendo os radicais em excesso. Entretanto quando ocorre um aumento na produção de radicais e diminuição da defesa antioxidante, este processo desencadeia o estresse oxidativo que causa danos e disfunções em muitos componentes vitais para a manutenção celular (Vaziri et al., 2003).

As frutas e os vegetais contêm muitos compostos com comprovadas propriedades antioxidantes, como compostos fenólicos, carotenóides, antocianinas e tocoferóis, que podem agir como agentes redutores (terminadores de radicais livres), quelante de metais, supressores de oxigênio singlete ou doadores de hidrogênio, inibindo ou reduzindo reações que desencadeiam o estresse oxidativo nas células (Hur et al., 2014).

Entre as frutas potencialmente antioxidantes, a polpa do fruto do açaí (*Euterpe oleracea* Mart. e *Euterpe precatória* Mart.), tem chamado bastante atenção por seu elevado potencial antioxidante e benefícios à saúde. A juçara (*Euterpe edulis* Mart.) é uma palmeira pertencente à família do açaí, cultivada na região da Mata Atlântica e muito conhecida por produzir um palmito de excelente qualidade e apenas recentemente, o fruto da palmeira juçara tem emergido como uma fonte promissora de antioxidantes naturais (Borges et al., 2011). Um maior efeito protetor de extrato de juçara contra estresse oxidativo induzido por hidroxiperoxido em células Vero em comparação ao ácido gálico, confirmou o potencial *in vivo* da juçara como agente antioxidante (Borges et al., 2013).

Entretanto a polpa do açaí e da juçara são altamente perecíveis, e o processamento é fundamental para aumentar a vida de prateleira. Porém, pode ocasionar diminuição do seu potencial antioxidante, já que os compostos como as

antocianinas são muito instáveis ao processo e estocagem (Tonon, Brabet, Hubinger, 2008).

O processo de secagem por atomização é uma técnica amplamente utilizada que transforma alimentos líquidos em pós utilizando altas temperaturas por um curto período de tempo. Os produtos obtidos por esta técnica apresentam boa qualidade, baixa atividade de água e fácil manuseio, transporte e estocagem (Tonon et al., 2009). Entretanto as altas temperaturas empregadas podem ocasionar mudanças na composição dos alimentos e induzir a oxidação de compostos naturalmente presentes, levando à formação de radicais livres que podem desencadear reações de oxidação e degradação do produto (Kurzeja et al., 2012).

A fermentação é um dos processos mais utilizados em alimentos (Osuntoki, Korie, 2010) e os *Lactobacillus* spp. são micro-organismos probióticos mais conhecidos devido aos populares produtos lácteos fermentados e seu consumo é comumente associado a hábitos saudáveis (Elmer, Mcfarland, Mcfarland, 2007).

O aumento da atividade antioxidante de produtos fermentados por bactérias probióticas tem sido amplamente investigado (Dordevic, Siler-Marinkovic, Dimitrijevic-Brankovic, 2010; Di Cagno et al., 2011). Entretanto este é o primeiro estudo que visa avaliar o efeito de extrato de juçara fermentado por bactérias probióticas contra o estresse oxidativo induzido, antes e após o processo de desidratação por spray dryer.

Vários métodos têm sido aplicados para avaliar atividades antioxidantes de alimentos, porém, não existe um único método universal que possa medir precisa e quantitativamente a atividade antioxidante (Bratosezkec, Polak, 2012), por isso recomenda-se o uso de ao menos dois ensaios combinados para proporcionar um resultado confiável da capacidade antioxidante de um gênero alimentício (Prior, Wu, Schaich, 2005).

O estudo da atividade antioxidante em sistemas de cultivo celulares, como o *burst* de neutrófilos, complementam ensaios químicos como o método de captura do radical DPPH•, fornecendo informações importantes que podem elucidar o mecanismo de estresse oxidativo em relação ao efeito antioxidante. Além disso, estes estudos são utilizados para embasar pesquisas sobre antioxidantes antes de estudos em animais e humanos (Farias et al., 2014).

A técnica de espectroscopia de ressonância paramagnética eletrônica (RPE), é uma técnica amplamente empregada que permite a detecção de espécies com

elétrons desemparelhados (ex. radicais livres, metais de transição) e que pode muitas vezes auxiliar na identificação do radical (Bartoszek, Polak, 2012; Zhang et. al., 2015).

Baseado nisso, este trabalho objetivou avaliar a atividade antioxidante de juçara fermentada pelos probióticos *Lactobacillus reuteri* e *Lactobacillus plantarum* antes e após a desidratação por spray drying (utilizando maltodextrina, goma acácia e gelatina como agentes carreadores de secagem), por testes *in vitro* de sequestro do radical DPPH• e por ensaio em *burst* de neutrófilos. Após a secagem os pós produzidos com *L. reuteri* foram submetidos ao armazenamento por 90 dias em temperatura ambiente (25 °C) em BOPP (polipropileno biorientado) para verificar a formação de radicais livres por espectroscopia de ressonância paramagnética, além da manutenção dos compostos fenólicos e da capacidade antioxidante pelo sequestro do radical DPPH•.

5.2 MATERIAIS E MÉTODOS

5.2.1 Obtenção do Extrato de Juçara

Para obtenção dos extratos de juçara, os frutos foram colhidos na safra 2013 dos palmiteiros *Euterpe edulis* produzidos na Fazenda Bimini (Rolândia, Paraná, Brasil). Os frutos foram lavados com água corrente e sanitizados em água clorada (200 mg.kg⁻¹) por 30 minutos. Em seguida, foram enxaguados e despulpados (Macanuda DM-Ji-05, Brazil) com água potável na proporção 2:1 (p/v) e as sementes separadas. O extrato de juçara assim obtido, foi congelado em porções de 250 mL.

Para fermentação dos extratos de juçara, os mesmos foram descongelados sob refrigeração por 18 h e filtrados utilizando tecido para remoção da borra. Em seguida, foram filtrados com papel de filtro qualitativo utilizando o funil de Büchner com vácuo. O pH do extrato filtrado foi ajustado conforme item 2.2 e foi pasteurizado em banho-maria a 80 °C por 1 min, seguido de resfriamento em banho de gelo.

5.2.2 Micro-organismos e Fermentação do Extrato de Juçara

As linhagens probióticas de *Lactobacillus reuteri* LR92 e *Lactobacillus plantarum* BG112 foram cedidas pela Clerici Sacco (Itália) e mantidas congeladas

em extrato de juçara pasteurizado contendo 20 % (v/v) de glicerol estéril e 0.01 % (m/v) da cultura em pó. Previamente aos ensaios, o pré-inóculo foi obtido por meio de duas ativações em extrato de juçara pasteurizado e incubado em estufa a 37 °C por 18 h.

A fermentação do extrato de juçara pasteurizado pelos probióticos foi realizada conforme condições pré-estabelecidas de: pH inicial de 5.7 (ajustado com NaOH) e temperatura de incubação de 32 °C para o *L. reuteri* e, pH inicial de 5.0 e temperatura de incubação de 25 °C para *L. plantarum*. Ambas fermentações ocorreram por 30 h.

Para aumentar a sobrevivência dos probióticos durante a secagem, foram adicionados ao extrato de juçara pasteurizado e antes da fermentação, 1 mM de betaína e 1 mM de glutamina (Santivarangkna, Kulozik, Foerst, 2008; Teixeira et. al., 2014).

5.2.3 Spray Drying

Previamente à secagem por spray drying, aos extratos de juçara fermentados foram adicionados em condições assépticas, 10% (m/v) de agentes carreadores de secagem (maltodextrina 10DE – Ingredion, Brazil; goma acácia – Nexira, Brasil; gelatina – PB Leiner), sob agitação magnética para homogeneização. Para dissolução da maltodextrina e goma acácia, a homogeneização foi realizada em temperatura ambiente por 10 min e para a gelatina em temperatura de 45 °C por 20 min para auxiliar na dissolução.

Para secagem do extrato de juçara contendo os probióticos foi utilizado o atomizador (LabPlant SD-05, Huddersfield, Inglaterra) em escala laboratorial com agulha de 0.7 mm de diâmetro e câmara principal de 500 mm x 215 mm. As condições de processo de secagem foram estabelecidas de acordo com ensaios prévios para obtenção de maior sobrevivência bacteriana. Assim para secagem dos extratos de juçara fermentados com *L. reuteri* e *L. plantarum* foram utilizadas as seguintes condições: 60 m³.h⁻¹ de fluxo de ar, 0.11 MPa de pressão de ar, 0.52 L.h⁻¹ de fluxo de alimentação e temperatura de entrada de 150 ± 1 °C.

5.2.4 Avaliação do Efeito de Armazenamento sobre Extrato de Juçara Fermentado com *L. reuteri* e desidratado

O extrato fermentado com *L. reuteri* e desidratado por spray drying utilizando maltodextrina, goma acácia e gelatina como agentes carreadores de secagem, foram embaladas em BOPP e armazenado à 25 °C por 90 dias. A cada 30 dias o teor de fenólicos totais e atividade antioxidante foi determinado em triplicata. A determinação da formação de radicais livres foi realizada entre 0 e 90 dias de armazenamento.

5.2.5 Determinação do Teor de Fenólicos Totais

Para a determinação do conteúdo de fenólicos totais do extrato foi empregado o método de Folin-Ciocalteu (Fang, Bhandari, 2011) e ácido gálico como padrão com algumas modificações. 0.5 mL dos extratos diluídos ou padrões, foram homogenizados com 2.5 mL do reagente de Folin-Ciocalteu. Após incubação por 5 min à 50 °C, 2 mL de solução saturada de carbonato de sódio foram adicionados e a absorbância das amostras foi medida em espectrofotômetro (Libra S22, Biochrom, Cambridge, UK) à 760 nm. Soluções metanólicas de ácido gálico (Sigma-Aldrich) com concentração de 0,1 a 0,5 mM foram utilizadas para determinação da curva de calibração, e os resultados foram expressos como equivalente de ácido gálico (EAG)/g ou mL de amostra.

5.2.6 Medida da Atividade Antioxidante

Para medir a atividade antioxidante, os extratos foram preparados adicionando-se a amostra em etanol 80% na proporção 1:10, seguida de agitação por 20 min à 200 rpm (Marconi, MA 140/CFT, São Paulo, Brasil). As amostras seguiram para centrifugação (Harrier, Reino Unido) a 2000 x g por 10 min, para obtenção do sobrenadante. Os extratos foram armazenados a -22 °C até a utilização.

A capacidade de seqüestrar radical 2,2-difenil-1-picrilhidrazina (DPPH•) foi realizada segundo Brand-Williams et al. (1995) com modificações. Alíquotas de 50 µL do extrato da amostra foram adicionadas a 1 mL de tampão acetato (pH 5,5), 1

mL de etanol absoluto, 0,5 mL de solução de DPPH• 250 $\mu\text{mol.L}^{-1}$, e a mistura armazenada no escuro por 30 min, seguido de leitura em espectrofotômetro a 517 nm. Como branco foi utilizado uma solução de 1,0 mL de tampão acetato 100 mM pH 5,5 com 1,5 mL de etanol absoluto. A quantificação dos extratos foi feita por meio de curva padrão de Trolox (0,5 a 20 $\mu\text{mol.L}^{-1}$) e os resultados expressos em μmol de Trolox por grama de amostra.

5.2.7 Medida da Produção de Espécies Reativas de Oxigênio (ROS) por Neutrófilos

Para medir a produção de espécies reativas de oxigênio por neutrófilos foi utilizada a quimiluminescência de acordo com Farias et al., (2014) em um leitor de placas multilabel (Victor X-3, PerkinElmer™, USA). Os neutrófilos foram obtidos a partir do isolamento de sangue de voluntários humanos e saudáveis. Em seguida, em um tubo cônico de 12 mL foi adicionado 2 mL de Histopaque 1.119 e 2,0 de Histopaque 1.077, lentamente para que se formassem camadas distintas. 6 mL de sangue total foram adicionados pela parede do tubo de tal forma a não se misturar ao Histopaque. O tubo foi centrifugado por 30 min a 1000 rpm e 22 °C. Em seguida, a interface de neutrófilos foi retirada cuidadosamente utilizando uma pipeta Pasteur e transferida para um tubo cônico limpo. À suspensão de células foi acrescentado o dobro do seu volume de PBS com glicose e albumina. Após lenta homogeneização, o tubo foi centrifugado, por 10 minutos a 1000 rpm. O sobrenadante foi descartado e o sedimento foi ressuspensão novamente com o dobro de volume em PBS e centrifugado, por 1 min a 1000 rpm. Após o descarte do sobrenadante, a lise de hemácias foi realizada utilizando água destilada e inversão lenta do tubo por aproximadamente 30 segundos. Por fim, cerca de 3 mL de PBS foi adicionado e o tubo centrifugado por 1 min a 1000 rpm. O sobrenadante foi descartado e o pellet ressuspensão com PBS até completar 1 mL. A contagem e a viabilidade celular foram avaliadas utilizando a técnica de exclusão por Trypan blue, visualizado em Câmara de Neubauer no microscópio óptico (40x). Para isso, 10 μL de células foram adicionados a 240 μL de trypan blue. Em seguida, a contagem foi realizada no quadrante central da câmara e a viabilidade avaliada em toda câmara. As células incolores foram consideradas viáveis e as azuis (que permitiram a entrada do corante) foram consideradas não viáveis. Conhecendo a concentração da solução, foi possível ajustar para $2,5 \times 10^6$ células/mL.

A medida do burst respiratório foi realizada no dia do isolamento dos neutrófilos (dia da coleta de sangue) por quimiluminescência (QL). Este experimento foi conduzido em um leitor de microplaca (Victor X-3, PerkinElmer, EUA), em um modo de contagem não coincidente por 60 minutos e uma faixa de resposta entre 300 a 620 nm. Na microplaca, em cada poço foram adicionados 200 μL de neutrófilos, seguido de 50 μL de luminol 20 mM, 10 μL das soluções diluídas de extrato de juçara fermentado líquido ou desidratado por spray dryer (20 $\mu\text{g}/\text{mL}$), 50 μL de PMA (forbol miristato) 5 μM . Após homogeneização, submeteu-se a solução a leitura, com um tempo de contagem de 60 minutos e temperatura de 30 $^{\circ}\text{C}$ ($\pm 1,0$ $^{\circ}\text{C}$). Os testes foram realizados, pelo menos, em quatorze repetições. A quantificação foi feita em CPM (contagens por minuto). Nos ensaios controles foi medida a produção espontânea (sem estímulo) de quimiluminescência de cada composto isoladamente, para a avaliação de possíveis interferentes da reação. Os resultados foram expressos através de valores dos picos das curvas cinéticas e apresentados na forma de quartis (1° e 3°).

5.2.8 Medida da Formação de Radicais Livres por RPE

A formação de radicais nas amostras desidratadas de juçara fermentada com *L. reuteri* utilizando maltodextrina, goma acácia e gelatina como agentes carreadores de secagem, foi analisada nas amostras logo após a secagem e após 90 dias de armazenamento para avaliação do efeito da estocagem na produção de radicais. Como controles e para verificar a origem e possível formação de radicais, foram realizadas leituras de RPE também no extrato de juçara não fermentado e liofilizado; nos agentes carreadores e na bactéria liofilizada, todos em pó e na forma como são comercializados.

Os experimentos de RPE foram conduzidos em um espectrômetro JEOL (JES-PE-3X) operando em banda X (~9.5 GHz) e modulação de campo magnético em 100 KHz. As medidas foram realizadas nas amostras em pó em tubos de quartzo de 3 mm de diâmetro em temperatura ambiente. As medidas foram realizadas com o marcador de campo magnético $\text{MgO}:\text{Mn}^{2+}$, que foi mantido na cavidade do equipamento de RPE, cujo sinal foi obtido simultaneamente com os sinais das amostras.

5.2.9 Análise Estatística

Os resultados do teste *in vitro* para as análises de conteúdo de fenólicos totais e DPPH• estão apresentados como média \pm DP. O teste de Tukey foi conduzido ao nível de 95% de nível de confiança utilizando o Software Statistica versão 7.0 (Statsoft, USA).

Os resultados da análise do *burst* respiratório foram analisados através do teste não paramétrico de Kruskal-Wallis complementado com o teste de Dunn. Os resultados estão apresentados como média dos resultados mínimo e máximos considerando o pico de valores para cada curva.

5.3 RESULTADOS

5.3.1 Fenólicos Totais e Atividade Antioxidante de Juçara Fermentada por *L. reuteri* e *L. plantarum* Antes e Após Desidratação por Spray Drying

O extrato fermentado por *L. reuteri* apresentou conteúdo de compostos fenólicos significativamente ($p < 0,05$) maior do que o extrato fermentado com *L. plantarum* (Tabela 1). Da mesma forma, após o processo de desidratação por atomização, os pós obtidos com *L. reuteri* continham de 648,2 a 1468,9 mg EAG/100g de compostos fenólicos e 113,63 a 250,5 μ M trolox/mL de atividade antioxidante, e com exceção da gelatina, apresentaram valores estatisticamente maiores em relação aos pós fermentados com *L. plantarum* (738,87 a 1345,3 mg EAG/100g e 114,42 a 165,92 μ M trolox/mL, respectivamente).

Também foi observada uma maior retenção de compostos com capacidade antioxidante em função do agente carreador de secagem utilizado. Neste caso, os pós produzidos com goma acácia apresentaram os maiores teores de fenólicos totais e atividade antioxidante seguido da maltodextrina e gelatina (Tabela 1).

Tabela 1. Fenólicos totais e capacidade antioxidante de juçara fermentada pelos probióticos *L. reuteri* e *L. plantarum* antes e após secagem por atomização com diferentes agentes carreadores.

Amostra	Análise			
	Fenólicos (mg EAG / 100 mL ou g)		DPPH* (µM trolox/mL ou g)	
	<i>L. reuteri</i>	<i>L. plantarum</i>	<i>L. reuteri</i>	<i>L. plantarum</i>
Líquido	560 ±11.19 ^{aA}	537 ±10,8 ^{aB}	177.63 ±14.42 ^{aA}	171.25 ±18.83 ^{aA}
Goma Acácia	1468,9 ±33.64 ^{bC}	1345.3 ±32.7 ^{bD}	250.5 ±24.42 ^{bB}	165.92 ±10.16 ^{aC}
Maltodextrina	945.8 ±10.92 ^{cE}	895.34 ±2.18 ^{cF}	140.19 ±21.65 ^{cC}	128.94 ±10.44 ^{bC}
Gelatina	648.2 ±29.13 ^{aG}	738.87 ±18.20 ^{dH}	113.25 ±16.18 ^{cD}	114.42 ±16.63 ^{bD}

Resultados em média ± DP de três repetições.

Letras minúsculas sobrescritas diferentes na mesma coluna denotam diferenças significativas ($p < 0,05$) pelo teste Tukey.

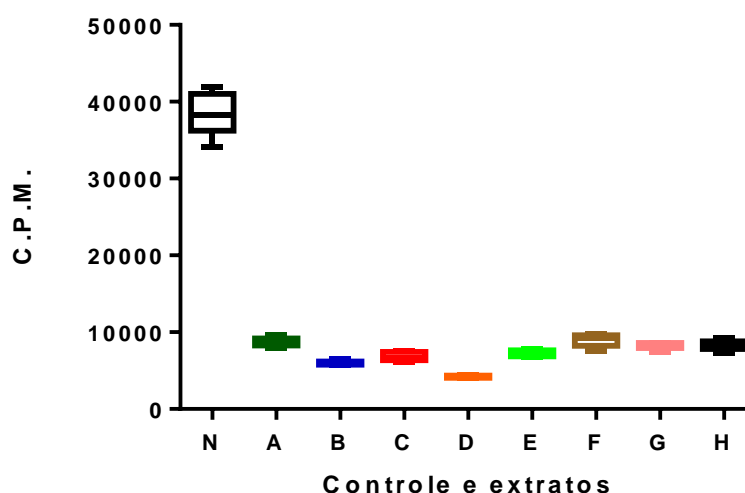
Letras maiúsculas sobrescritas diferentes na mesma linha para a mesma análise, denotam diferenças significativas ($p < 0,05$) pelo teste Tukey.

5.3.2 Efeito do Extrato de Juçara Fermentado Líquido ou Desidratado Sobre ROS Produzidos por Neutrófilos

No presente estudo, os neutrófilos foram estimulados com PMA para imitar situações de inflamações agudas ligadas a intensa produção de ROS e liberação de enzimas granulares. Quando os neutrófilos foram estimulados com PMA em presença dos extratos de juçara, um efeito inibidor significativo ($p < 0,001$) da produção de ROS foi observado para todas as formulações.

A Figura 1 mostra o resultado da análise estatística do teste de Dunn na presença de amostras de juçara fermentadas com os probióticos *L. reuteri* e *L. plantarum* antes e após secagem por atomização utilizando diferentes agentes carreadores. Os resultados mostraram que todas as amostras de juçara fermentadas líquidas ou desidratadas, apresentaram luminescências significativamente ($p < 0,001$) menores que o controle de neutrófilos (c.p.m 30.000 a 40.000). As amostras fermentadas por *L. plantarum* desidratadas apresentaram uma maior inibição ao *burst* oxidativo de neutrófilos em relação à amostra líquida, e a amostra fermentada com *L. reuteri* e desidratada com goma acácia a mais efetiva na inibição de ROS produzidos por neutrófilos (c.p.m 0 a 10.000).

Figura 1. Efeito da presença de extratos de juçara fermentado por probióticos antes e após o processo de atomização com diferentes agentes carreadores de secagem (concentração das amostras no burst 20 µg/mL) na ativação de neutrófilos humanos por PMA).



Cada grupo foi composto por pelo menos 14 replicatas. Plotagem dos valores de pico da curva cinética. Resultados foram analisados por Kruskal-Wallis complementado com teste de Dunn. * $p < 0,001$ comparado com o controle. C.p.m = contagem por minuto de espécies reativas de oxigênio; N = controle; A = *L. plantarum* líquido; B = *L. reuteri* líquido; C = *L. plantarum* goma acácia; D = *L. reuteri* goma acácia; E = *L. plantarum* gelatina; F = *L. reuteri* gelatina; G = *L. plantarum* maltodextrina; H = *L. reuteri* maltodextrina.

5.3.3 Efeito do Armazenamento por 90 Dias à 25 °C no Conteúdo de Compostos Fenólicos e Sequestro do Radical DPPH* de Juçara Fermentada por *L. reuteri* e Desidrata com Diferentes Agentes Carreadores

A partir dos resultados nos ensaios anteriores, o probiótico *L. reuteri* foi escolhido para realização das análises de armazenamento e detecção de radicais por RPE.

Na Tabela 2 estão apresentados os resultados de compostos fenólicos totais e atividade antioxidante dos pós de extrato de juçara probiótico produzidos com maltodextrina, goma acácia ou gelatina durante armazenamento por 90 dias à 25 °C. Ambos os parâmetros avaliados, o conteúdo total de compostos fenólicos e atividade antioxidante pelo sequestro do radical DPPH*, apresentaram uma queda significativa ($p < 0,05$) nos valores para todas as amostras em relação ao tempo inicial, sendo a queda mais acentuada nas amostras desidratadas com gelatina, seguida da goma acácia e maltodextrina.

Tabela 2. Atividade antioxidante e determinação de fenólicos totais de amostras de extrato de juçara fermentado com *L. reuteri* LR92 e desidratadas com diferentes agentes carreadores de secagem durante armazenamento à 25 °C por 90 dias.

Dias	Fenólicos totais (mg EAG /100g)			DPPH (umol de trolox / g)		
	Goma arábica	Maltodextrina	Gelatina	Goma arábica	Maltodextrina	Gelatina
0	1354.32±26,78 ^a	955.23±18,76 ^a	524.9±11,56 ^a	221,2±24,44 ^a	117,7±14,42 ^a	115,42±24,42 ^a
30	972.23±16,43 ^b	944.63±9,42 ^a	285.62±7,93 ^b	115.81±8,43 ^b	103,94±10,23 ^b	55.2±13,22 ^b
60	738.18±28,71 ^c	885.81±10,54 ^b	188.05±7,42 ^c	93.31±4,97 ^c	99.88±9,20 ^b	26.95±2,12 ^c
90	665.73±15,87 ^d	769.38±21,01 ^c	163.24±5,69 ^d	86.19±5,32 ^c	89.25±4,67 ^c	25.08±12,76 ^c

Resultados em média ± DP de três repetições.

Letras minúsculas sobrescritas diferentes na mesma coluna denotam diferenças significativas ($p < 0,05$) pelo teste Tukey.

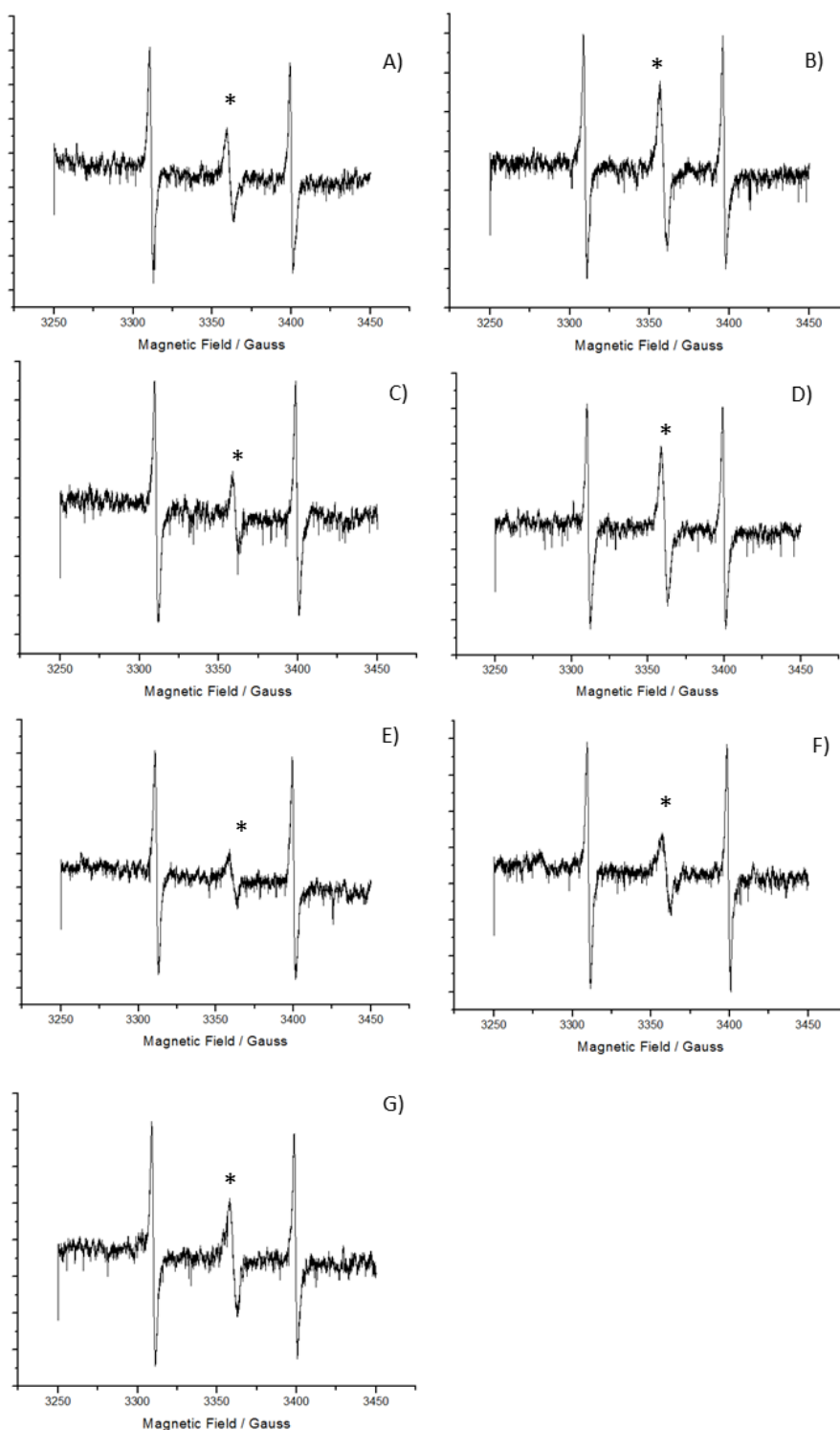
5.3.4 Formação de Radicais Livres Imediatamente Após Desidratação e Após 90 Dias de Armazenamento em Amostras de Juçara Fermentada com *L. reuteri*

Comparando-se os radicais detectados pela técnica de ressonância paramagnética foi possível observar que todas as amostras contendo extrato de juçara, inclusive a não fermentada e desidratada por liofilização (secagem pelo frio) apresentaram um pequeno sinal de RPE característico de radical que foram similares (Fig 2), e após 90 dias de armazenamento a 25 °C, um aumento na intensidade do sinal foi observado. As amostras contendo apenas os agentes carreadores ou a bactéria, não apresentaram sinais de RPE.

Os sinais dos radicais formados foram derivatizados e integrados para cálculo da área e número de espécies de radical em relação à quantidade de amostra e o tipo de radical foi caracterizado de acordo com seu fator espectrocóscopico (g) e largura de linha (ΔH_{pp}). Na Tabela 3 estão apresentados os resultados dos parâmetros obtidos, e assim como observado nos espectros (Fig. 2), a concentração de radicais livres nas amostras logo após a secagem foram similares, com um pequeno aumento no número de espécies paramagnéticas após 90 dias de armazenamento.

Os valores semelhantes do fator g e ΔH_{pp} indicam que o mesmo radical está presente em todas as amostras de extrato de juçara, e os baixos valores do fator g são característicos de elétrons desemparelhados alocados nos átomos de oxigênio (O) e carbono (C) presentes no extrato de juçara com baixa ligação spin-órbita (Kurzeja, et. al., 2013).

Figura 2. Espectros de RPE dos pós de juçara fermentado com *L. reuteri* utilizando diferentes agentes carreadores de secagem nos tempos 0 e 90 dias de armazenamento à 25 °C.



Goma acácia t=0 (A); goma acácia t=90 (B); maltodextrina t=0 (C); maltodextrina t=90 (D); gelatina t=0 (E); gelatina t=90 (F); extrato de juçara liofilizado sem bactéria (controle) (G).

* = sinal de EPR obtido para cada amostra.

Sinais laterais representam o marcador de campo magnético MgO:Mn²⁺.

Tabela 3. Parâmetros de RPE* obtidos para as amostras de extrato de juçara liofilizado e fermentado com *L. reuteri* e desidratadas por atomização utilizando diferentes agentes carreadores de secagem.

Amostra	g	ΔH_{pp} (G)	Nº de espécies do radical por grama
Extrato de juçara liofilizado	2,005	4,96	3,03402E+15
Extrato de juçara + goma acácia t=0	2,004	4,05	7,80815E+14
Extrato de juçara + maltodextrina t=0	2,004	4,00	7,83504E+14
Extrato de juçara + gelatina t=0	2,004	4,45	7,41017E+14
Extrato de juçara + goma acácia t=90	2,004	4,69	3,65067E+15
Extrato de juçara + maltodextrina t=90	2,004	4,23	2,67421E+15
Extrato de juçara + gelatina t=90	2,004	5,31	2,64243E+15

*RPE: Ressonância paramagnética eletrônica

g = fator espectroscópico;

ΔH_{pp} = largura de linha;

G = Gauss

5.4 DISCUSSÃO

Vários estudos têm comprovado que a formação de ERO/ERN acarreta danos moleculares (oxidação lipídica e protéica, danos ao DNA, entre outros) que podem causar uma interrupção das funções biológicas e favorecer o aparecimento de doenças degenerativas como Parkinson, Alzheimer além da formação de câncer (Varize et al., 2003), o que torna o estudo de novas fontes de alimentos com compostos que inibam estes radicais, de suma relevância.

Em estudos anteriores, foi observado que a fermentação do extrato de juçara pelos probióticos *L. reuteri* e *L. plantarum* ocasiona um aumento no conteúdo de compostos fenólicos e atividade antioxidante em relação à juçara “*in natura*”. Entretanto para estimar a atividade antioxidante em matrizes como alimentos e fluidos biológicos, o uso de mais de um método é frequentemente apropriado pois estes são limitados e diferem na duração de análise e quantificação (Roginski, Lissi, 2005).

O presente estudo mostrou que todos os extratos fermentados de juçara, apresentaram efeito antioxidante *in vitro* pelos métodos avaliados, ou seja, através da eliminação do ânion superóxido (O_2^-) no *burst* respiratório de neutrófilos e através da doação de elétrons na análise de DPPH•.

O efeito da atividade antioxidante dos fermentados de juçara antes e após o processo de desidratação no *burst* oxidativo de neutrófilos foi avaliado através da análise de quimiluminescência usando luminol como marcador. Este é um método direto que consiste na determinação da intensidade da quimiluminescência, que é diretamente proporcional a concentração de um radical em estado estacionário responsável pela luminescência seja qual for a atividade deste radical. Por isso é possível medir a ação antioxidante de um determinado composto em relação aos radicais livres produzidos no *burst* respiratório (Vladimirov, Proskurnina, 2009).

A atividade antioxidante destes extratos pode estar relacionada ao poder redutor da estrutura química dos compostos fenólicos e antocianinas presentes no fruto da juçara (Borges et. al., 2013; Farias et al., 2014) e, as diferenças observadas em relação aos probióticos estudados podem estar relacionadas à característica de cada espécie.

De acordo com Kulisaar et. al., (2002), algumas espécies de bactérias lácticas apresentam enzimas antioxidantes como superóxido dismutase (SOD), NADH oxidase, NADH peroxidase e catalase, que podem resultar em maior aumento na atividade antioxidante do produto fermentado. Além disso, e o *L. reuteri* tem demonstrado ser superior na capacidade de reduzir danos oxidativos durante choques endotóxicos quando comparado a outras espécies de *Lactobacillus* (Juarez et al., 2013), o que pode justificar a diferença obtida entre as espécies estudadas.

As frutas de maneira geral são muito perecíveis devido ao alto teor de umidade, o que torna necessário o processamento para que estejam disponíveis por um maior período de tempo. Neste contexto, o processo de secagem é um método muito empregado para a conservação de alimentos, que apresenta a vantagem de facilitar manuseio e transporte (Mestry, Mujundar, Thorat, 2011). Entretanto este processo pode afetar de maneira mínima ou máxima substâncias nutritivas que estejam presentes nas frutas e nos alimentos de maneira geral e, por isso, diversos autores têm avaliado o uso de agentes carreadores de secagem na preservação e manutenção de compostos bioativos que sejam sensíveis à remoção da água (Tonon et al., 2010; Ferrari et. al., 2012, Pereira et al., 2014).

Embora diferentes trabalhos tenham demonstrado a degradação de antocianinas durante secagem por atomização, no presente estudo as amostras fermentadas por *L. plantarum* desidratadas apresentaram uma maior inibição ao *burst* oxidativo de neutrófilos em relação às amostras líquidas. A amostra fermentada por *L. reuteri* e desidratada com goma acácia apresentou maior inibição em relação à amostra líquida, que por sua vez, apresentou o mesmo efeito em relação aos outros agentes carreadores. Este resultado pode ser explicado devido à possível proteção exercida pela goma acácia, maltodextrina e gelatina nos compostos antioxidantes e nas células bacterianas, e este resultado está de acordo com o teor de compostos fenólicos encontrados no presente estudo. Desta forma, sugere-se que o maior efeito inibidor do *burst* de neutrófilos está principalmente correlacionado ao maior teor de compostos fenólicos e à maior capacidade de sequestrar o radical DPPH• observada nos ensaios químicos.

Entre os agentes carreadores, os pós produzidos com goma acácia continham o maior teor de compostos fenólicos e atividade antioxidante, confirmando que a goma acácia apresenta o maior efeito protetor nos componentes antioxidantes da juçara fermentada durante a secagem. Oliveira et al., (2013) obtiveram maior teor de antocianinas e atividade antioxidante em polpa de morango desidratada por spray drying quando utilizaram goma acácia como agente carreador. Segundo estes autores o pó produzido por este material apresenta uma maior densidade aparente de suas partículas, ou seja, menos ar incluso no interior das partículas, o que ocasiona uma menor taxa de difusão do oxigênio e conseqüentemente menor oxidação dos compostos presentes.

Tonon et. al., (2010) avaliando o uso da maltodextrina, goma acácia e amido de tapioca como agentes carreadores de secagem de polpa de açaí, não observaram diferenças significativas entre a maltodextrina e a goma acácia em relação ao conteúdo de antocianinas e capacidade antioxidante logo após a secagem, entretanto a maltodextrina foi mais efetiva durante o armazenamento, assim como o observado no presente trabalho.

Além da degradação das antocianinas (Katsube et al., 2009), o processo de desidratação por altas temperaturas pode ocasionar a oxidação de alguns compostos lipídicos, levando à formação ou o aumento na quantidade de radicais livres presentes em amostras desidratadas (Szöcs, 2002). Desta forma, o presente estudo avaliou se o processo de atomização da juçara fermentada poderia

influenciar a oxidação de compostos com produção de radicais livres e, se estes poderiam influenciar negativamente no potencial antioxidante.

Nos espectros de RPE foi observado o aparecimento do mesmo radical nas amostras fermentadas atomizadas e no extrato não fermentado liofilizado (controle), sugerindo que o processo de atomização não influenciou a formação de radicais livres e sua origem pode ser proveniente do próprio fruto da juçara ou da extração de sua polpa. Além disso, os antioxidantes presentes na juçara podem ter agido prevenindo a formação de mais radicais livres ou através da formação de um radical menos ativo (Halliwell et. al., 1995), e compostos fenólicos estão presentes em vegetais como forma de proteção contra a luz ultra-violeta e visível (Heim, Tagliaferro, Bobilya, 2002).

O fraco e simétrico sinal do radical singleto obtido, com $g = 2,0040$ e largura de linha pico-à-pico (ΔH_{pp}) = $4,5 \pm 0,8$ mT tem sido reportado como sendo comum em plantas como resultado de suas atividades metabólicas (Ahn et al., 2014). E, embora sua origem não esteja totalmente clara, estudos sugerem que sejam radicais livres tipo semiquinonas ou tipo ligninas, remanescentes do metabolismo de plantas ou que são produzidos pela oxidação de polifenóis ou ácidos graxos presentes nos vegetais (Ikeya, Baffa, Mascarenhas, 1989; Yordanov, Miadenova, 2007).

Alguns autores sugerem que a lignina seja primeiramente degradada por enzimas extracelulares a porções menores, e posteriormente sejam susceptíveis à absorção por células microbianas onde são convertidas a fenóis e quinonas, dessa forma, estas substâncias são liberadas junto com enzimas oxidativas ao meio ambiente, onde são polimerizadas por mecanismos de formação de radicais livres (Tuomela et. al., 2000; Fialho et. al., 2010).

Uma outra hipótese apresentada é que tanto o açaí quanto a juçara são consumidos em forma de polpa, extraídas em despoldadeira ou bateadeira juntamente com água potável, e este processo poderia causar a incorporação de ar e iniciar o processo de oxidação dos lipídios presentes nos frutos, entretanto estudos mais aprofundados são necessários para elucidar a origem dos radicais observados no extrato de juçara no presente estudo.

Apesar do uso de altas temperaturas, a secagem por spray dryer é muito utilizada para desidratação de alimentos e produtos farmacêuticos, devido ao curto tempo de produção e pode ser utilizada para componentes sensíveis presentes em alimentos (Ferrari et al., 2012) e por isso pode não ter influenciado a produção ou

proliferação de mais radicais no extrato de juçara. Meynier et al. (2014) relataram que a atomização de ovos e gema de ovo não ocasionou a oxidação dos colesteróis presentes no ovo e Ahn et al., (2014) observou que diferentes técnicas de pré-tratamento de algas marinhas poderiam acarretar em um aumento na intensidade e no tipo dos radicais presentes em amostras posteriormente irradiadas.

As concentrações dos radicais nas amostras de juçara foram semelhantes entre si e, embora um aumento no número de espécies após 90 dias de armazenamento tenha sido observado, estes valores foram menores em relação a concentração de radicais obtidos em diferentes tipos de ervas (10^{18} spins/g) (Kurzeja et al., 2012) e folhas de amoreira esterilizadas (10^{18} spins/g) (Kurzeja et al., 2013).

O aumento no número de radicais livres observados após 90 dias de estocagem, pode estar relacionado à diminuição da atividade antioxidante e compostos fenólicos durante este período, visto que a estocagem dos alimentos é uma importante etapa para a qualidade do produto e manutenção de compostos biologicamente ativos. Como já discutido previamente, as antocianinas presentes na juçara, são compostos muito sensíveis à estocagem, devido a fatores como temperatura, luz, pH, oxigênio entre outros (Ersus, Yurdagel, 2007), e a temperatura ambiente de armazenamento em contato com o oxigênio residual da embalagem, podem ter afetado diretamente na atividade antioxidante da juçara fermentada desidratada.

O teor de compostos fenólicos totais e a atividade antioxidante das partículas produzidas com maltodextrina apresentaram a maior estabilidade durante o armazenamento seguida por partículas de goma acácia e, a menor, foi aquela apresentada por amostras contendo gelatina, e isto pode ser explicado pela característica filamentosa dos pós obtidos pela gelatina (dados não mostrados) que possibilitam maior área de contato com o oxigênio dentro e fora das partículas. De acordo com Tonon et. al. (2010) a degradação de antocianinas presentes no suco de açaí atomizado e a diminuição na atividade antioxidante pode ser atribuída ao material não encapsulado que está em contato o oxigênio.

Apesar da diminuição da atividade antioxidante e aumento no número de radicais observados durante o armazenamento em temperatura ambiente, os processos fermentativos e secagem por atomização são eficazes para a manutenção das propriedades benéficas do extrato de juçara fermentado por bactérias probióticas, pois não produziram aumento na intensidade e nos tipos dos

radicais observados pela técnica de EPR logo após a secagem. Esta hipótese pôde ser comprovada pelos resultados obtidos no efeito protetor no ensaio de *burst* de neutrófilos. Entretanto o armazenamento sob vácuo e/ou refrigeração devem ser estudados para obtenção de um produto que seja também estável durante a etapa de estocagem.

5.5 CONCLUSÃO

Os extratos de juçara fermentados com *L. reuteri* apresentaram as maiores atividades antioxidantes tanto na forma líquida quanto na desidratada, sendo as amostras atomizadas com o agente carreador de secagem goma acácia as com os maiores efeitos observados contra danos oxidativos. Desta forma, apesar da presença de radicais livres no extrato de juçara detectados pela técnica de RPE, os compostos fenólicos e as bactérias probióticas presentes nos produtos desidratados, podem ter agido prevenindo a formação de um número maior de radicais livres ou inibindo reações de propagação, que poderiam contribuir para a manutenção dos efeitos benéficos como verificado no teste de *burst* de neutrófilos. Portanto conclui-se que o processo de fermentação e desidratação por atomização do extrato de juçara com diferentes agentes carreadores, ocasiona um aumento do potencial antioxidante e do efeito contra danos ocasionados pelo estresse oxidativo. Entretanto o armazenamento prolongado em temperatura ambiente pode ser prejudicial na estabilidade oxidativa do produto.

AGRADECIMENTOS

À Daniel Steidle da Fazenda Bimini pelo fruto da juçara utilizado neste estudo e ao *Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico* (CNPq) Brasil, pelo apoio financeiro, número de processo: 479623/2012-0 e em forma de bolsa de estudo para K. B. G.

5.6 REFERÊNCIAS

Ahn, J.J., Sanyal, B., Park, E. J., Lim, H, K., Kwon, J. H. (2014). Effects of samples pretreatments on EPR spectral characteristics of irradiated sea algae – an advanced approach to identify irradiation status. *RSC Advances*, 4, 32312-32319.

Anvisa. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (Brazilian Health Surveillance Agency). Informe Técnico (Technical Report) nº 3, 25 October 2007. Hidróxido de sódio (Sodium hydroxide) – INS 524. Brasília. Brazil.

AOAC. Association of Official Analytical Chemists. (2006). Official Methods of Analysis of the Association of Official Analytical Chemists, 18th Ed.; AOAC Press: Gaithersburg, MD.

Bartoszek, M., Polak, J. (2012). Na electron paramagnetic resonance study of antioxidante properties of alcoholic beverages. *Food Chemistry*, 132, 2089-2093.

Borges, G. da S. C., Vieira, F. G. K., Copetti, C., Gonzaga, L. V., Zambiasi, R. C., Filho, J. M., Fett, R. (2011). Chemical characterization, bioactive compounds, and antioxidant capacity of Jussara (*Euterpe edulis*) fruit from the Atlantic Forest in southern Brazil. *Food Research International* 44, 2128-2133.

Borges, G. da S. C., Gonzaga, L. V., Jardini, F. A., Filho, J. M., Heller, M., Micke, G., Costa, A. C. O., Fett, R. (2013). Protective effect of *Euterpe edulis* M. on Vero cell culture and antioxidant evaluation based on phenolic composition using HPLC – ESI-MS/MS. *Food Research International*, 51, 363-369.

Boskov-Hansen, H., Andersen, M. F., Nielsen, L. M., Back-Knudsen, K. E., Meyer, A. S., Christensen, L. P., et al. (2002). Changes in dietary fibre, phenolic acids and activity of endogenous enzyme during rye bread making. *European Food Research and Technology*, 214, 33-42.

Brand-Williams W, Cuvelier ME, Berset C. (1995). Use of free radical method to evaluate antioxidant activity. *Lebensmittel-Wissenschaft Technologie (LWT)*. 28, 25-30.

De Brito, E. S., De Araújo, M. C. P., Alves, R. E., Carkeet, C., Clevidence, B. A., Noyotny, J. A. (2007). Anthocyanins present in selected tropical fruits: Acerola, Jambolão, Jussara, and Guajiru. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 55, 9389-9394.

Deiana, M., Corona, G., Incani, A., Loru, D., Rosa, A., Atzeri, A. (2010). Protective effect of simple phenols from extravirgin olive oil against lipid peroxidation in intestinal Caco-2-cells. *Food and Chemical Toxicology*, 48, 3008-3016.

Di Cagno, R., Surico, R. F., Minervini, G., Rizello, C. G., Lovino, R., Servili, M., Taticchi, A., Urbani, S., Gobbetti, M. (2011). Exploitation of sweet cherry (*Prunus avium* L.) puree added of stem infusion through fermentation by selected autochthonous lactic acid bacteria. *Food Microbiology* 28, 900-909.

Dordevic, T. M., Siler-Marinkovic, S. S., Dimitrijevic-Brankovic, S. I. (2010). Effect of fermentation on antioxidant properties of some cereals and pseudo cereals. *Food Chemistry*, 124 (1), 957-963.

Elmer, W. G.; Mcfarland, V. L.; Mcfarland, M. The power of probiotics. Improving your health with beneficial microbes. The Harworth Press, Inc., 2007. 236 p.

Ersus, S., Yurdagel, U. (2007). Microencapsulation of anthocyanin pigments of black carrot (*Daucus carota* L.) by spray dryer. *Journal of Food Engineering*, 80 (3), 805-812.

Fang, Z., Bhandari, B. (2011). Effect of spray drying and storage on the stability of bayberry polyphenols. *Food Chemistry*. 129, 1139-1147.

Farias, C. C. de., Bonifácio, K. L., Matsumoto, A. K., Higachi, L., Casagrande, R., Moreira, E. G., Barbosa, D. S. (2014). Comparison of the antioxidant potential of antiparkinsonian drugs in different *in vitro* models. *Brazilian Journal of Pharmaceuticals Sciences*, 50 (4), 819-826.

Ferrari, C. C., Germer, S. P. M., Alvim, I. D., Vissotto, F. Z., Aguirre, de J. M. (2012). Influence of carrier agentes on the physicochemical properties of blackberry powder produced by spray drying. *International Journal of Food Science and Technology*, 47 (6), 1237-1245.

Fialho, L. L., Silva, W. T. L., Milori, D. M. B. P., Simões, M. L., Martin-Neto, L. (2010). Interferência da lignina na quantificação de radicais livres no processo de compostagem. *Química Nova*, 33 (2), 364-369.

Garbín, V. P. (2011). Análise da atividade antimicrobiana dos extratos dos frutos, óleos das sementes e fungos isolados da palmeira juçara (*Euterpe edulis* Martius 1824). Dissertação de mestrado. Universidade Federal do Paraná, Curitiba.

Hayek, S., Shahbazi, A., Worku, M., Ibrahim, S. A. (2013). Enzymatic activity of *Lactobacillus reuteri* grown in a sweet potato based medium with the addition of metal ions. *Springerplus* 2: 465.

Heim, K. E., Tagliaferro, A. R., Bobylia, D. J. (2002). Flavonoid antioxidants: chemistry, metabolismo and structure-activity relationships. *Journal of Nutritional Biochemistry*, 13, 572-584.

Hou, J. W., Yu, R. C., Chou, C. C. (2000). Changes in some components of soymilk during fermentation with *Bifidobacteria*. *Food Research International* 33, 393-397.

Hur, S. J., Lee, S. Y., Kim, Y. C., Choi, I., Kim, G. B. (2014). Effect of fermentation on the antioxidant activity in plant-based foods. *Food Chemistry*, 160, 346-356.

Hunaefl, D., Akumo, D. N., Smetanska, I. (2013). Effect of fermentation on antioxidant properties of red cabbages. *Food Biotechnology*, 27, 66-85.

Ikeya, M., Baffa, F. O., Mascarrenhas, S. (1989). Quality assessment of coffee beans with ESR and gamma-ray irradiation. *Applied Irradiation and Isotopes*, 40, 1219-1222.

- Jaiswal, A. K., Abu-Ghannam. (2013). Kinetics studies for the preparation of probiotic cabbage juice: Impact on phytochemicals and bioactivity. *Industrial Crops and Products* 50, 212-218.
- Katsube, T.; Tsurunaga, Y.; Sugiyama, M.; Furuno, T.; Yamasaki, Y. (2009). Effect of air-drying temperature on antioxidant capacity and stability of polyphenolic compounds in mulberry (*Morus alba* L.). *Food Chemistry*, 113 (4), 964–969..
- Kullisaar T, Zilmer M, Mikelsaar M, Vihalemm T, Annuk H, Kairane C, Kilk A. (2002). Two antioxidative lactobacilli strains as promising probiotics. *International Journal of Food Microbiology*: 72: 215-224.
- Kurzeja, E., Stec, M., Ramos, P., Pilawa, B., Pawlowska-Góral, K. (2012). The influence of sterilization on free-radical generation, discoloration and the antioxidant properties of certain spice herbs. *Italian Journal of Food Science*, 24, 254-262.
- Kurzeja, E., Stec, M., Ramos, P., Pilawa, B., Pawlowska-Góral, K (2013). Antioxidant properties of water extracts of sterilized and unsterilized *Morus Alba* L. leaves. *International Journal of Food Properties*, 16, 723-737.
- Li S, Zhao Y, Zhang L, Zhang X, Huang L, Li D, Niu C, Yang Z, Wang Q. 2012. Antioxidant activity of *Lactobacillus plantarum* strains isolated from traditional Chinese fermented foods. *Food Chemistry* 132, 1914-1919.
- Mestry, A. P., Mujumdar, A. S., Thorat, B. N. (2011). Optimization of spray drying of an innovative functional food: fermented mixed juice of carrot and watermelon, 29, 1121-1131.
- Meynier, A., Leborgne, C., Viau, M., Schuck, P., Guichardant, M., Rannou, C., Anton, M. (2014). N-3 fatty acids enriched eggs and production of egg yolk powders: An increased risk of lipid oxidation? *Food Chemistry*, 153, 94-100.
- Moraes Filho, M. L. de, Hirozawa, S. S., Prudencio, S. H., Ida, E. I., Garcia, S. (2014). *International Journal of Food Science and Nutrition* 65 (4), 470-475.
- Oliveira, M. I. S., Tonon, R. V., Nogueira, R. I., Cabral, L. M. C. (2013). Estabilidade da polpa de morango atomizada utilizando diferentes agentes carreadores. *Brazilian Journal of Food Technology*, 16 (4), 310-318.
- Otieno, D. O., Ashton, J. F., Shah, N. P. (2005). Stability of β -glucosidase activity produced by *Bifidobacterium* and *Lactobacillus* spp. in fermented soymilk during processing and storage. *Journal of Food Science* 70 (4), M236-M241.
- Osuntoki, A., Korie, I. (2010). Antioxidant activity of whey from milk fermented with *Lactobacillus* species isolated from Nigerian fermented foods. *Food Technology and Biotechnology*, 48 (4), 505-511.
- Pan D, Mei X. (2010). Antioxidant activity of an exopolysaccharide purified from *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* 12. *Carbohydrate Polymers* 80, 908-914.

Peres, C. M., Peres, C., Hernández-Mendoza, A., Malcata, F. X. (2012). Review on fermented plant materials as carriers and sources of potentially probiotic lactic acid bacteria: With an emphasis on table olives. *Trends in Food Science & Technology* 26 (1), 31-42.

Pereira, A. L. F., Almeida, F. D. L., Lima, M, A., Costa, J. M. C., Rodrigues, S. (2014). Spray-drying of probiotic cashew apple juice. *Food Bioprocess Technology*, 7, 2492-2499.

Prior, R. L., Wu, X., Schaich, K. (2005). Standardized methods for the determination of antioxidant capacity and phenolics in foods and dietary supplements. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53, 4290-4302.

Roginski, V., Lissi, E. A. (2005). Review of methods to determine chain-breaking antioxidant activity in food. *Food Chemistry* 92, 235-254.

Sanchez-Gonzales I, Jiménez-Escrig A, Saura-Calixto F. (2005). In vitro antioxidant activity of coffee brewed using different procedures (Italian, Espresso and Filter). *Food Chemistry* 90, 133-139.

Santivarangka, C., Kulozic, U., Foerst, P. (2008). Protection mechanism of sugars during different stages of preparation process of dried lactic starter cultures. *Food Microbiology*, 25, 429-441.

Silva, M. G. P. C., Barreto, W. S., Serôdio, M. H. 2004. Comparação nutricional da polpa dos frutos de juçara e de açaí. In: XVIII CONGRESSO BRASILEIRO DE FRUTICULTURA. Florianópolis, Santa Catarina, 22 a 26 de novembro de 2004. Anais...CD ROOM, Florianópolis, SC.

Spagna, G., Barbagallo, R. N., Pifferi, P. G., Blanco, R. M., Guisan, J. M. (2000). Stabilization of a β -glucosidase from *Aspergillus niger* by binding to an amine agarose gel. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, Amsterdam 11, 63-69.

Szöcs, F. (2002). Free Radicals in wheat seeds studied by electron spin resonance. *Journal of Food Science*, 67 (6), 2079-2082.

Teixeira, J. S., Seeras, A., Sacher-Maldonado, A. F., Zhang, C., Su, M. S. Ganle, M. G. (2014). Glutamine, glutamate, and arginine-based resistance in *Lactobacillus reuteri*. *Food Microbiology*, 42, 172-180.

Tonon, R. V., Brabet, C., Hubinger, M. D. (2008). Influence of process conditions on the physicochemical properties of açaí (*Euterpe oleracea* Mart.) powder produced by spray drying. *Journal of Food Engineering*, 88, 411-418.

Tonon, R. V., Baroni, A. F., Brabet, C., Gilbert, O., Pallet, D., Hubinger, M. D. (2009). Water sorption and glass transition temperature of spray dried açaí (*Euterpe oleracea* Mart.) juice. *Journal of Food Engineering*, 94, 215-221.

Tonon, R. V., Brabet, C., Hubinger, M. D. (2010). Anthocyanins stability and antioxidant activity of spray-dried açaí (*Euterpe oleracea* Mart.) juice produced with different carrier agents. *Food Research International*, 43, 907-914.

Tuomela, M., Vikman, M., Hatakka, A., Itävaara, M. (2000). Biodegradation of lignin in a compost environment: a review. *Bioresource Technology*, 72, 169-183.

Vaziri, N.D., Dicus, M., Ho, N.D. *et al.* (2003). Oxidative stress and dysregulation of superoxide dismutase and NADPH oxidase in renal insufficiency. *Kidney International*, 63, 179-185.

Vladimirov, Y. A., Proskurina, E. V. (2009). Free radicals and cell chemiluminescence. *Biochemistry*, v. 74 (13), p. 1545-1566.

Zhang, Q. A., Shen, Y., Fan, X., Martín, J. F. G., Wang, X., Song, Y. Free radical generation induced by ultrasound in red wine and model wine: An EPR spin-trapping study.(2015). *Ultrasonics Sonochemistry*, 27, 96-101.

CONCLUSÃO GERAL

A passagem da polpa de juçara pelo processo de digestão *in vitro*, ocasionou uma diminuição no teor de antocianinas e compostos fenólicos totais, entretanto, devido à quantidade expressiva presente no fruto, 46 % ainda permaneceram para chegar ao cólon, onde podem ser utilizados pela microbiota residente para produção de compostos com maiores efeitos metabólicos. A fermentação *in vitro* da polpa de juçara digerida, ocasionou mudanças significativa na microbiota presente com o aumento de espécies benéficas como *Bifidobacterium* spp e aumento na produção de ácidos graxos de cadeia curta como o acetato e o propionato, que apresentam efeitos benéficos comprovados no organismo humano.

Com o potencial risco de extinção, estudos envolvendo a diversificação de consumo do fruto da juçara tornam-se amplamente necessários e o presente trabalho mostrou que o extrato de juçara puro pode ser utilizado para fermentação por bactérias probióticas. Desta forma, o máximo crescimento celular foi obtido nas condições de temperatura de 32 °C e pH 5,7 para o *Lactobacillus reuteri* e 25 °C e pH 5,0 para o *Lactobacillus plantarum*. Ambos probióticos fermentaram os açúcares presentes no extrato de juçara e produziram ácido lático, entretanto o consumo pelo *L. reuteri* foi mais rápido em relação ao *L. plantarum*. O processo fermentativo também favoreceu o aumento da atividade antioxidante dos extratos e ambos microorganismos permaneceram viáveis em níveis elevados, durante o armazenamento de 28 dias sob refrigeração (4°C).

A desidratação é a maneira mais utilizada para a conservação de produtos perecíveis e, o extrato de juçara fermentado por *L. reuteri* e desidratado, apresentou níveis de células viáveis acima de 10⁶ UFC/g após o processo por spray dryer. Entretanto o agente carreador utilizado exerceu influência significativa na sobrevivência do probiótico e nas características tecnológicas do produto. Neste sentido, a gelatina foi o carreador que melhor protegeu as células logo após a secagem e durante 90 dias de armazenamento à 4 °C, entretanto apresentou o menor rendimento de processo, solubilidade e menor retenção de compostos fenólicos totais e atividade antioxidante. Por sua vez, os pós produzidos com goma acácia e maltodextrina apresentaram sobrevivências menores em relação à gelatina, mas maiores rendimentos, melhor solubilidade e, maior retenção de compostos fenólicos e atividade antioxidante.

Os pós produzidos apresentaram conteúdo de umidade abaixo de 4%, e o dados experimentais das isotermas obtidas, foram bem ajustados ao modelo GAB com alto coeficiente de determinação (> 0.99).

Espécies paramagnéticas foram encontradas nos extratos de juçara não fermentado e, fermentado e desidratado por spray dryer, e embora estas espécies estejam relacionadas à processos de oxidação, todas as amostras de extrato de juçara fermentadas com probióticos, na forma líquida e desidratada com diferentes agentes carreadores, apresentaram efeito contra o estresse oxidativo induzido, em *burst* de neutrófilos.

A temperatura de 25 °C para o armazenamento dos pós, exerceu o maior efeito na perda de viabilidade dos probiótico durante os 90 dias de estocagem e, tanto a temperatura quanto o tipo de embalagem influenciaram na mudança de cor dos produtos armazenados. Neste sentido a temperatura de 4 °C em embalagem de BOPP, foram as melhores condições de armazenamento para a manutenção da cor e da viabilidade celular.

O armazenamento em temperatura ambiente (25 °C) também ocasionou a diminuição da atividade antioxidante dos pós produzidos com os diferentes agentes carreadores, além disso um aumento na quantidade de radicais presentes na polpa foi constatado.

Desta forma conclui-se que o consumo da polpa de juçara na alimentação humana pode trazer benefícios fisiológicos através da modulação intestinal, além de auxiliar no efeito contra danos ocasionados pelo estresse oxidativo e, é um substrato relevante para o uso de bactérias probióticas.

Entretanto estudos visando o ajuste dos agentes carreadores de secagem e diferentes formas de armazenamento, como o vácuo, são necessários para se obter um produto benéfico e estável nas condições de comercialização. Além disso, sugere-se novas pesquisas para a determinação de quais compostos fenólicos são efetivamente utilizados para a fermentação do extrato de juçara tanto pela microbiota intestinal, como pelas bactérias probióticas comerciais.

ANEXOS

ANEXO 1: CERTIFICADO DE QUALIDADE DA MALTODEXTRINA**Certificado de Qualidade**

Mogi Guaçu, 05/11/2012

Fábrica: MOGI GUAÇU		
Produto: MALTODEXTRINA		
Marca: MOR REX® 1910		
Lote: 0000661978	Fabr.: 19/05/2012	Val.: 19/05/2014

Análises

Umidade, %
 Dextrose Equivalente
 pH
 Solúveis, %
 Cinzas, %
 Asp. Maltodextrina
 Odor
 Cor
 Sabor
 SO₂, ppm
 Contagem Total Bactérias, UFC/g
 Bolores e leveduras
 Coliforme Total, NMP/g
 Coliforme Fecal, NMP/g
 E.Coli, NMP/g
 Bacillus cereus UFC/g
 Staphylococcus aureus, UFC/g
 Clostridio Sulfito Redutor/g
 Salmonella/Shigella, UFC/g

Resultados

4,6
 10,2
 4,9
 100
 0,2
 A
 A
 2,50
 A
 3
 10
 10
 Ausente
 Ausente
 Ausente
 0
 Ausente
 Ausente
 Ausente

LAUDO EMITIDO ELETRONICAMENTE

ANEXO 2: CERTIFICADO DE QUALIDADE DA GOMA ACÁCIA

129,Chemin de Croisset
B.P. 4151
76723 Rouen cedex 3
France
Tl : + 33 (0) 2 32 83 18 18
Fax : + 33 (0) 2 32 83 19 19

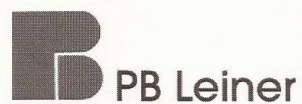


TECHNICAL DATA SHEET	FIBREGUM B	
Version :12	Created on : 14/10/2005	Last update : 08/11/2011
Content : Acacia gum purified and instanstised (soluble dietary fiber)		
Legal position : 2008/84/EC, 95/2/EC, USP/NF, FCC, Eur.Ph.		
Standard Packaging : Net 25 kg paper bags with inner polyethylene liner		
Maximun Storage : 3 years Storage Condition : Keep closed in cool and dry place		

MATERIAL CHARACTERISTICS

Physical and chemical data					
Analysis	Description	MINI	MAXI	Unit	Test method
Moisture	5h @ 105°C		10	%	USP <921> Method III
Colour @ 25%	Aqueous solution 25% - Lovibond AF900		10	-	-
Total Ashes @ 600°C	8h @ 600°C		4	%	Eur. Ph.
Acid insoluble ashes	Ashes + acid hydrolysis		0,5	%	USP<561>
Acid insoluble matters	Gravimetric determination after acid hydrolysis		0,1	%	-
pH	25% aqueous solution, @ 20°C	4,1	5,0	-	Eur. Ph. 2.2.3
Viscosity 25%	25%, Brookfield LVF 60 rpm @ 20°C	60	100	mPa.s	-
Total dietary fibre (on dry weight)	Enzymatic & gravimétric	90		%	AOAC 985.29
Mesh size powder through 63µm	Vacuum sieving		15	%	-
Bacteriology					
Analysis	Description	MINI	MAXI	Unit	Test method
Total Plate Count	72 h @ 30°C - PCA		500	ufc/g	ISO 4833
E. coli (test for the presence of)	48 h @ 44°C - EP without indole + Kovacs reagent		abs/5g	-	ISO 7251
Salmonella (test for the presence of)	Pre-enrichment, 24 h @ 41°C		abs/25g	-	ISO 6579

ANEXO 3: CERTIFICADO DE QUALIDADE DA GELATINA



CERTIFICADO DE ANÁLISES

CLIENTE: UNIVERSIDADE ESTADUAL DE LONDRINA

PRODUTO: GELATINA BOVINA COMESTÍVEL

LOTE: L00000058

QUALIDADE: 220 BLOOM / 30 MESH

DATA DE FABRICAÇÃO: SETEMBRO / 2012

QUANTIDADE: 500 g

DATA DE VENCIMENTO: SETEMBRO / 2017

FÍSICO-QUÍMICA:	LIMITE:	RESULTADO:	UNIDADE:	METODOLOGIA:
Bloom 6,66%	210 – 230	215	g	AOAC
Viscosidade 6,66%	29 – 39	33	mPs	BSI
Umidade	≤ 12	≤ 12	%	GME
Cinzas	≤ 2	≤ 2	%	USP
pH 1%	4,7– 6,5	5,7	ppm	BSI/GMIA
Metais pesados	≤ 20	≤ 20		USP
Arsênico	≤ 1	≤ 1	ppm	AAS
Nitrogênio	≥ 15	≥ 15	%	KJELDAHL
Dióxido de enxofre (SO ₂)	≤ 40	≤ 40	ppm	TITUL.IODOM.
Granulometria	30	30	Mesh	ASTM

MICROBIOLÓGICA:	LIMITE:	RESULTADO:	UNIDADE:	METODOLOGIA:
Contagem Total	<1000	<1000	UFC/g	USP
<i>Escherichia coli</i>	Ausência	Ausência	/ 25g	USP
<i>Salmonella sp.</i>	Ausência	Ausência	/ 25g	AOAC

01/06/13
Bruna Sacchetto A. Amorim
 Controle de Qualidade

DATA DE EMISSÃO DE CERTIFICADO:
 01 / julho / 2013