UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
Faculdade de Ciências Farmacêuticas
Programa de Pós-Graduação em Ciência dos Alimentos
Área de Bromatologia

Subprodutos de acerola como fontes de compostos fenólicos em leites
fermentados probióticos

Tatyane Lopes de Freitas

Dissertação para obtenção do grau de
MESTRE

Orientadora:
Prof. Dr. Maria Inés Genovese

São Paulo
2017

TATYANE LOPES DE FREITAS

Subprodutos de acerola como fontes de compostos fenólicos em leites
fermentados probióticos

Versão Original

Dissertação apresentada à Faculdade de
Ciências Farmacêuticas da Universidade
de São Paulo para obtenção do título de
Mestre em Ciências

Área de concentração: Bromatologia

Orientadora:
Prof. Dr. Maria Inés Genovese

São Paulo

2017

Ficha Catalográfica
Elaborada pela Divisão de Biblioteca e
Documentação do Conjunto das Químicas da USP

L862s Lopes de Freitas, Tatyane
 Subprodutos de acerola como fontes de compostos
 fenólicos em leites fermentados probióticos / Tatyane
 Lopes de Freitas. - São Paulo, 2017.
 77 p.

Dissertação (mestrado) - Faculdade de Ciências
Farmacêuticas da Universidade de São Paulo.
Departamento de Alimentos e Nutrição Experimental.
Orientador: Genovese, Maria Ines

1. Polifenóis. 2. Subprodutos agrícolas. 3.
Alimentos funcionais. 4. Probióticos. I. T. II.
Genovese, Maria Ines, orientador.

TATYANE LOPES DE FREITAS

Subprodutos de acerola como fontes de compostos fenólicos em leites
fermentados probióticos

Comissão Julgadora

da

Dissertação para obtenção do grau de Mestre

Prof. Dr. Maria Inés Genovese
Orientador / Presidente

1º examinador

2º examinador

São Paulo, _____ de _____ de 2017.

DEDICATÓRIA

*Dedico este trabalho ao meu marido,
Raphael, pelo incentivo e apoio,
Às minhas filhas, Júlia e Helena,
minhas razões para seguir em frente, e
À minha orientadora, Inés,
pela oportunidade e confiança.*

Obrigada, de coração!!!

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus pelas bênçãos recebidas, pela presença constante nesta caminhada.

Ao meu marido, Raphael, meu maior incentivador, sempre elogiando meu trabalho e me apoiando. Às minhas queridas filhas, Júlia e Helena, por me darem forças para continuar e por entenderem a minha ausência quando precisei me dedicar a este trabalho.

Aos meus pais, que sempre me incentivaram a estudar, nunca desistir.

À minha orientadora, Inés, pela oportunidade que me deu de estudar em uma das melhores universidades do mundo! Foi a única que me disse “sim” em meio a tantas negativas, acreditando em meu potencial e confiando em meu trabalho. Obrigada pela paciência e ensinamentos!

Obrigada às empresas doadoras dos resíduos de frutas: Sítio do Bello e Cutrale.

À professora Susana Saad, idealizadora e colaboradora deste projeto, sempre muito atenciosa abriu as portas de seus laboratórios para que eu pudesse dar continuidade a este estudo. Aos seus alunos, Diogo, Marcela e Raquel, especialmente Diogo, ao qual obrigada é pouco, pois sem ele este trabalho não teria sido possível. Ensinou-me tanto, auxiliou nas análises, deu bronca quando necessário... Um anjo que caiu do céu! Obrigada, meu amigo!

Muito obrigada aos companheiros do Laboratório de Compostos Bioativos: Alice, Carlos, Daniel, Fabiana, Flavia, Gabriela, Helena, Heloísa, Júlia, Luana, Márcio, Maria Gabriela, Renata e Simone. Em especial, Márcio e Renata, pelos ensinamentos, conselhos, suporte e risadas. Com vocês meus dias ficaram mais leves e divertidos!

Aos técnicos de laboratório: Rosa, Elias, Alexandre, Luciene, Tatiana e Laila, pela ajuda nas análises, ensinamentos e paciência, e aos funcionários da secretaria do Departamento de Alimentos e Nutrição Experimental: Mônica, Edilson, Roberta e Cléo, e do Departamento de Tecnologia Bioquímico-Farmacêutica: Elza, Rose e Ivani. Aos funcionários da secretaria de pós-graduação, Irineu e Sueli.

Agradeço aos professores da Faculdade de Ciências Farmacêuticas que me ajudaram de alguma forma, seja com ensinamentos e/ou cedendo seus equipamentos: Inar de Castro, Cristina Bogsan, Juliana Ract e Uelinton Pinto, e também à professora Katia Sivieri da UNESP de Araraquara, colaboradora deste projeto e membro da banca de qualificação.

Para finalizar, agradeço à CAPES, pela concessão da bolsa de estudos, e à Fapesp, pelo auxílio financeiro ao projeto temático.

Meus sinceros agradecimentos!!!

RESUMO

FREITAS, T. L. **Subprodutos de acerola como fontes de compostos fenólicos em leites fermentados probióticos**. 2017. 77f. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2017.

Subprodutos de frutas são rotineiramente descartados pelas indústrias. Porém, são ricos em compostos bioativos, podendo ser utilizados como ingredientes em produtos funcionais, promovendo a saúde e minimizando o impacto ambiental. O objetivo deste trabalho foi estudar o potencial funcional de subprodutos desidratados de acerola e de laranja, como fontes de compostos fenólicos, e desenvolver leites fermentados probióticos adicionados deste resíduo, avaliando suas características físico-químicas durante o armazenamento sob refrigeração (28 dias; 4 ± 1 °C), bem como o impacto das condições gastrointestinais sobre os flavonoides e as cepas probióticas. Os subprodutos foram obtidos em indústrias de processamento de frutas do estado de São Paulo, e foram realizadas as seguintes análises para caracterizá-los: composição centesimal, teores de vitamina C, minerais, fibras alimentares, compostos fenólicos totais e proantocianidinas, capacidade antioxidante *in vitro* e perfil cromatográfico de flavonoides (CLAE). Foram elaboradas quatro formulações de leites fermentados: F0 (controle), sem adição de resíduo de acerola (RA); F2, com 2% de RA; F5, com 5% de RA; F10, com 10% de RA. Adicionou-se a cultura probiótica ABT-4 nos produtos, constituída de duas cepas probióticas: *Bifidobacterium animalis* subsp *lactis* Bb-12 e *Lactobacillus acidophilus* La-5, além da cultura starter *Streptococcus thermophilus*. As seguintes análises foram realizadas com as formulações de leites fermentados, durante o armazenamento sob refrigeração (28 dias, 4 ± 1 °C): composição centesimal, pH, acidez, viabilidade dos microrganismos, teor de compostos fenólicos totais (CF), cor e textura instrumentais. Além disso, os leites fermentados foram submetidos a condições gastrointestinais simuladas *in vitro*, para avaliação do impacto na viabilidade das cepas probióticas e nos compostos fenólicos. O RA mostrou-se excelente fonte de vitamina C (605 mg/100 g b.u.), além de apresentar melhor capacidade antioxidante *in vitro* do que o RL. Proantocianidinas foram encontradas apenas no RA, na concentração de 617 µg EC/g b.s. O teor de compostos fenólicos totais do RA (3240 µg EAG/100 g b.s.) foi 3,6 vezes maior que o do RL. Os principais compostos fenólicos encontrados no RA foram: derivados de quercetina, procianidina B1, rutina, e derivados de caempferol. No RL, foram identificados: naringenina, sinensetina, homorientina, isovitexina e derivados de ácido clorogênico. Os subprodutos estudados apresentaram elevados teores de fibras totais (acima de 60%) e proteínas totais (RA: 10,4%; RL: 9,9%), além de reduzido teor de lipídeos totais (RA: 1,6%; RL: 2,6%). Os principais minerais identificados em ambos os resíduos foram: potássio, magnésio, cálcio e fósforo. Quanto às quatro formulações de leites fermentados, estas apresentaram baixo teor de lipídeos totais (menor que 1%), e o teor de proteínas totais variou entre 3,9 e 5,1 g/100 g, estando de acordo com a legislação vigente para este tipo de produto. O pH das formulações F0 (controle) e F2 manteve-se estável significativamente ($p > 0,05$) ao longo do período de armazenamento sob refrigeração (28 dias; 4 ± 1 °C), e das outras formulações sofreu pequena queda, mesmo assim mantendo-se acima de 4,5. A acidez das formulações, que variou entre 0,92 a 1,28 mg de ácido láctico/g, aumentou entre os dias 1 e 14 de armazenamento, depois se manteve até o final da vida de prateleira. O RA não interferiu de maneira negativa nas populações de microrganismos analisadas durante o armazenamento, já que as formulações F2, F5 e F10 mantiveram suas populações em torno de 8 log UFC/g. Quanto ao teor de CF, as amostras diferiram significativamente entre si ($p < 0,05$), sendo que F0 apresentou teor de 5 vezes inferior a F10 (21,13 e 101,13 µg EAG/100 g, respectivamente, no dia 1). A cor dos produtos se manteve até o final da vida de prateleira, e diferiram significativamente ($p < 0,05$) entre si. O RA influenciou pouco nos parâmetros de textura dos leites fermentados, mas a formulação controle foi a única que perdeu adesividade. Após a fase gástrica da digestão simulada *in vitro*, no 7º dia de armazenamento, as populações de bactérias probióticas diminuíram drasticamente (quedas em torno de 3 a 5 log UFC/g), e após a fase entérica não foram detectadas contagens. Por outro lado, os flavonoides encontrados nos leites fermentados adicionados de RA aumentaram em torno de 2 a 5 vezes, após a fase gástrica, mantendo-se ou sofrendo pequena queda após fase entérica. Estes resultados mostram que o pó de subprodutos de acerola é um valioso ingrediente a ser utilizado em alimentos funcionais, pois é rico em vitamina C, fibras e compostos fenólicos, agregando valor nutricional, além de servir como antioxidante natural. Seus flavonoides parecem ser altamente resistentes aos ácidos e sais da digestão, podendo, assim, exercer efeitos positivos sobre a saúde.

Palavras-chave: polifenóis, subprodutos agrícolas, laranja, acerola, leite fermentado, probióticos, digestão *in vitro*.

ABSTRACT

FREITAS, T. L. Acerola by-products as sources of phenolic compounds in probiotics fermented milks. 2017. 77p. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2017.

Fruits by-products are routinely discarded by industries. However, they are rich in bioactive compounds, and can be used as ingredients in functional foods, promoting health and minimizing environmental impact. The objective of this study was to investigate the functional potential of acerola and orange dehydrated by-products, as sources of phenolic compounds, and to develop probiotic fermented milks supplemented with this residues, evaluating its physico-chemical characteristics during refrigerated storage (28 days, 4 ± 1 °C), as well as the impact of gastrointestinal conditions on flavonoids and probiotic strains. The by-products were obtained from fruit processing industries of São Paulo, and the following analyzes were performed to characterize them: contents of moisture, ash, lipids, proteins, vitamin C, minerals, dietary fibers, total phenolic compounds and proanthocyanidins, antioxidant capacity *in vitro* and flavonoids chromatographic profile (HPLC). Were elaborated four formulations of fermented milks: F0 (control), without addition of acerola residue (AR); F2, with 2% AR; F5, with 5% AR; F10, with 10% AR. Was used the probiotic culture ABT-4, composed of two probiotic strains, *Bifidobacterium animalis* subsp *lactis* Bb-12 and *Lactobacillus acidophilus* La-5, in addition to the starter culture *Streptococcus thermophilus*. During the refrigerated storage (28 days, 4 ± 1 °C), the following analyzes were performed with the fermented milks: contents of moisture, ash, lipids and proteins, pH, acidity, viability of microorganisms, total phenolic compounds (PC), instrumental color and texture. In addition, the fermented milks were submitted to *in vitro* simulated gastrointestinal conditions to evaluate the impact on the viability of probiotic strains and phenolic compounds. AR presented excellent content of vitamin C (605 mg/100 g), in addition to presenting better antioxidant capacity *in vitro* than orange residue (OR). Proanthocyanidins were found only in AR (617 µg CE/g). The PC content of AR (3240 µg GAE/100 g) was 3.6 higher than in OR. The phenolic compounds identified in AR were quercetin-3-rhamnoside, rutin and others quercetin derivatives, procyanidin B1 and kaempferol derivatives. In OR, were identified naringenin, sinensetin, homorientin, isovitexin and chlorogenic acid derivatives. The by-products studied showed high total fibers content (above 60%) and total proteins (AR: 10.4%, OR: 9.9%), as well as reduced total lipids content (AR: 1.6%; OR: 2.6%). Both residues showed high levels of potassium, calcium, magnesium and phosphorus. The four formulations of fermented milks presented low total lipids content (below 1%), and the total proteins content ranged from 3.9 to 5.1 g/100 g, being in agreement with the legislation. The pH of F0 (control) and F2 formulations remained stable ($p > 0.05$) throughout the refrigerated storage period (28 days, 4 ± 1 °C), and the other formulations showed a small decreased, even thus remaining above 4.5. The acidity of the formulations, ranging from 0.92 to 1.28 mg of lactic acid/g, increased between days 1 and 14 of storage, then remained until the end of shelf life. The AR did not negatively interfere in the populations of microorganisms analyzed during storage, since the formulations F2, F5 and F10 maintained their populations around 8 log CFU/g. Regarding PC content, the samples differed significantly ($p < 0.05$), with F0 being about 5 lower than F10 (21.13 and 101.13 µg GAE/100 g, respectively, in the day 1). The instrumental color of the products remained until the end of shelf life, and differed significantly ($p < 0.05$) from each other. The AR influenced a little in the texture parameters of the fermented milks, but the control formulation was the only one that lost adhesiveness. After the gastric phase of the simulated digestion *in vitro*, on the 7th day of storage, the populations of probiotic bacteria decreased dramatically (of 3 to 5 log CFU/g), and after the enteric phase no colonies were detected. On the other hand, the flavonoids found in the fermented milks that were supplemented with AR increased from 2 to 5 times, after the gastric phase, maintaining or suffering small decreased after enteric phase. These results show that acerola by-products powder is a valuable ingredient to be used in functional foods because it is rich in vitamin C, dietary fibers and phenolic compounds, adding nutritional value, and serving as a natural antioxidant. Its flavonoids appear to be highly resistant to the acids and salts of digestion and can thus have positive effects on health.

Keywords: polyphenols, agricultural by-products, orange, acerola, fermented milk, probiotics, *in vitro* digestion.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Subprodutos de acerola <i>in natura</i> (A), e após secagem e trituração (B).	23
Figura 2. Fluxograma do processo de fabricação dos leites fermentados probióticos.	30
Figura 3. Perfil cromatográfico (270 nm) de flavonoides dos subprodutos desidratados de acerola.	43
Figura 4. Perfil cromatográfico (270 nm) de flavonoides dos subprodutos desidratados de laranja.	44
Figura 5. Perfil cromatográfico (270 nm) de ácidos fenólicos dos subprodutos desidratados de acerola.	44
Figura 6. Amostras de leites fermentados probióticos (da esquerda para a direita): F0 (formulação controle, sem adição de resíduo de acerola (RA)), F2 (2% de RA), F5 (5% de RA) e F10 (10% de RA)	55
Figura 7. Populações de <i>B. animalis</i> subsp <i>lactis</i> Bb-12 e <i>L. acidophilus</i> La-5, obtidas para os leites fermentados, antes de iniciar a simulação da digestão <i>in vitro</i> , e após a fase gástrica, realizada no 7º dia e no 28º dia de armazenamento sob refrigeração (4 ± 1 °C). Letras minúsculas distintas indicam diferenças significativas ($p < 0,05$) entre as formulações de leites fermentados para a mesma fase. Letras maiúsculas distintas indicam diferenças significativas ($p < 0,05$) entre os diferentes dias de armazenamento para a mesma fase de uma mesma formulação. nd: valores abaixo do limite de detecção do método utilizado. F0: sem adição de resíduo de acerola (RA); F2: 2% de RA; F5: 5% de RA; F10: 10% de RA.	58
Figura 8. Perfis cromatográficos (270 nm) de flavonoides dos leites fermentados, no 7º dia de armazenamento sob refrigeração (4 ± 1 °C). T0: antes da digestão <i>in vitro</i> ; T1: após fase gástrica; T3: após fase entérica 2 (final do ensaio). F2: 2% de resíduo de acerola (RA); F5: 5% de RA; F10: 10% de RA. (1) quercetina-3-ramnose, (2) rutina, (3) derivados de quercetina, (4) derivado de caempferol e (5) derivado de cianidina.	62

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Proporção dos ingredientes empregados na elaboração das quatro formulações de leites fermentados.	30
Tabela 2. Composição centesimal, valor energético total (VET), teor de vitamina C e teores de fibras dos resíduos de acerola (RA) e de laranja (RL).	37
Tabela 3. Composição de minerais dos resíduos desidratados de acerola (RA) e de laranja (RL).	40
Tabela 4. Teores de compostos fenólicos totais, proantocianidinas totais e capacidade antioxidante <i>in vitro</i> dos resíduos desidratados de acerola (RA) e de laranja (RL).	41
Tabela 5. Composição centesimal e VET das quatro formulações (F0, F2, F5 e F10) de leites fermentados probióticos.	46
Tabela 6. Valores de pH e acidez obtidos para os leites fermentados durante o armazenamento sob refrigeração (28 dias; 4 ± 1 °C).	47
Tabela 7. Populações de <i>Bifidobacterium animalis</i> subsp <i>lactis</i> Bb-12, <i>Lactobacillus acidophilus</i> La-5 e <i>Streptococcus thermophilus</i> (cultura <i>starter</i>) obtidas para os leites fermentados F0, F2, F5 e F10 durante o armazenamento sob refrigeração (28 dias; 4 ± 1 °C).	49
Tabela 8. Teores de compostos fenólicos totais dos leites fermentados F0, F2, F5 e F10 no produto final (1 dia) e após 14 e 28 dias de armazenamento sob refrigeração (4 ± 1 °C).	52
Tabela 9. Parâmetros de cor – luminosidade (L*) e coordenadas de cromaticidade (a* e b*) – dos leites fermentados F0, F2, F5 e F10 no produto final (1 dia) e após 14 e 28 dias de armazenamento sob refrigeração (4 ± 1 °C).	54
Tabela 10. Parâmetros de textura instrumental (dureza, adesividade, coesividade, elasticidade e gomosidade) dos leites fermentados F0, F2, F5 e F10 no produto final (1 dia) e após 14 e 28 dias de armazenamento sob refrigeração (4 ± 1 °C).	56
Tabela 11. Quantificação dos principais flavonoides encontrados nos leites fermentados adicionados de pó de subprodutos de acerola, antes, durante e após digestão simulada <i>in vitro</i>	61

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

%: porcentagem	FOS: fruto-oligossacarídeo
<: menor que	FRAP: ferric reducing antioxidant power
>: maior que	g: grama
±: mais ou menos	g: gravitacional
®: marca registrada	h: horas
°C: graus Celsius	HCl: ácido clorídrico
μ: micro	HPLC: high performance liquid chromatography
μg: micrograma	L: litro
μL: microlitro	mg: miligrama
μM: micromolar	min: minuto
μmol: micromol	mL: mililitro
ANOVA: análise de variância	mM: milimolar
b.s.: base seca	MRS: Agar DeMan-Rogosa, Sharpe
b.u.: base úmida	nm: nanômetro
CLAE: cromatografia líquida de alta eficiência	nM: nanomolar
DAD: detector de arranjo de diodo	nº: número
DP: desvio-padrão	ORAC: oxygen radical absorbance capacity
DPPH: 2,2-difenil-1-picril-hidrazil	pH: potencial Hidrogeniônico
EAG: equivalentes de ácido gálico	qPCR: Real Time Polymerase Chain Reaction
EC: equivalentes de cianidina	TGI: trato gastrointestinal
eq.: equivalente	UFC: unidades formadoras de colônias
EROS: espécies reativas de oxigênio	
et al.: e colaboradores	
VET: valor energético total	
α: alfa	

SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO	14
1.1.	Compostos fenólicos	14
1.2.	Subprodutos de frutas como fontes de compostos fenólicos	15
1.3.	Probióticos, prebióticos e simbióticos.....	18
1.4.	Polifenóis e a microbiota intestinal	20
2.	OBJETIVOS	22
2.1.	Objetivo Geral	22
2.2.	Objetivos Específicos	22
3.	MATERIAIS E MÉTODOS	23
3.1.	Obtenção e preparo dos subprodutos de acerola e de laranja.....	23
3.2.	Determinação da composição físico-química dos subprodutos desidratados de acerola e de laranja	23
3.2.1.	Composição centesimal e valor energético total (VET).....	23
3.2.2.	Fibras alimentares totais (FAT).....	24
3.2.3.	Vitamina C	25
3.2.4.	Composição de minerais	25
3.2.5.	Obtenção dos extratos metanólicos dos resíduos	25
3.2.6.	Compostos fenólicos totais.....	26
3.2.7.	Proantocianidinas totais.....	26
3.2.8.	Capacidade antioxidante <i>in vitro</i>	26
3.2.9.	Perfil de flavonoides por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE).....	28
3.3.	Produção de leites fermentados probióticos adicionados de subprodutos desidratados de acerola	29
3.4.	Determinação da composição físico-química e microbiológica dos leites fermentados durante o armazenamento sob refrigeração (4 ± 1 °C; 28 dias)	30
3.4.1.	Composição centesimal e valor energético total (VET).....	30
3.4.2.	pH	32
3.4.3.	Acidez titulável	32
3.4.4.	Viabilidade das culturas starter e probióticas.....	32
3.4.5.	Compostos fenólicos totais.....	33
3.4.6.	Cor instrumental	33
3.4.7.	Textura instrumental	34

3.5.	Simulação <i>in vitro</i> das condições gastrointestinais e viabilidade das cepas probióticas dos leites fermentados	34
3.6.	Identificação e quantificação de flavonoides dos leites fermentados após simulação <i>in vitro</i> das condições gastrointestinais.....	35
3.7.	Análise estatística dos dados	35
4.	RESULTADOS E DISCUSSÃO	37
4.1.	Caracterização físico-química dos resíduos desidratados de acerola (RA) e de laranja (RL)	37
4.1.1.	Composição centesimal, VET e teores de vitamina C, fibras totais e composição de minerais	37
4.1.2.	Teores de compostos fenólicos totais, proantocianidinas totais e capacidade antioxidante <i>in vitro</i>	40
4.1.3.	Perfil de flavonoides (CLAE-DAD)	43
4.2.	Parâmetros físico-químicos obtidos para os leites fermentados durante o armazenamento sob refrigeração (4 ± 1 °C; 28 dias).....	45
4.2.1.	Composição centesimal e VET	45
4.2.2.	pH e acidez	46
4.2.3.	Viabilidade dos microrganismos	48
4.2.4.	Compostos fenólicos totais.....	51
4.2.5.	Cor e textura instrumentais	53
4.3.	Impacto das condições gastrointestinais, simuladas <i>in vitro</i> , sobre as cepas probióticas e os compostos fenólicos dos leites fermentados	58
5.	CONCLUSÃO	65
6.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	66

1. INTRODUÇÃO

As doenças crônicas não transmissíveis (DCNT), representadas principalmente por doenças cardiovasculares, câncer, doenças respiratórias crônicas e diabetes, são responsáveis por cerca de 38 milhões de óbitos por ano, segundo levantamento feito pela Organização Mundial da Saúde. O sobrepeso e a obesidade, principalmente visceral, são os principais fatores de risco para o desenvolvimento destas doenças (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2014). No Brasil, o excesso de peso já atinge cerca de 53,8% da população, e os casos de obesidade aumentaram 60% em dez anos, passando de 11,8% em 2006 para 18,9% em 2016 (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2016).

1.1. Compostos fenólicos

Estudos epidemiológicos mostram uma associação inversa entre o consumo diário de frutas e hortaliças e o risco do desenvolvimento de DCNT. Os efeitos protetores destes alimentos têm sido atribuídos aos seus compostos bioativos, como compostos fenólicos, carotenoides e vitaminas C e E (HUANG; OU; PRIOR, 2005). No entanto, a última pesquisa realizada pelo Ministério da Saúde indica que apenas um entre três adultos consome frutas e hortaliças regularmente no Brasil (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2016).

Compostos fenólicos, ou simplesmente polifenóis, são metabólitos secundários de plantas e estão presentes em todos os vegetais. Diversas moléculas diferentes já foram identificadas, as quais são agrupadas em classes em função de sua estrutura química. A capacidade destas substâncias em reagir com radicais livres e espécies reativas de oxigênio (EROs) prevenindo o estresse oxidativo explica, em parte, a correlação entre a ingestão de compostos fenólicos e a redução do risco do desenvolvimento de doenças crônicas (CORREIA et al., 2012; BASTOS; ROGERO; ARÊAS, 2009).

Os compostos fenólicos se dividem em dois grupos: flavonoides e não-flavonoides. Os mais encontrados em frutas, especialmente nas folhas e nas cascas, são os flavonoides, que contêm em sua estrutura dois anéis aromáticos unidos por três carbonos. Suas subclasses principais são: flavonas, isoflavonas, flavonóis, flavanonas, flavan-3-óis e antocianidinas. Os não-flavonoides são representados por ácidos fenólicos e taninos (DEL RIO et al., 2013; CROZIER; JAGANATH; CLIFFORD, 2009).

Os flavonoides que estão ligados a uma ou mais moléculas de açúcar são chamados glicosídeos, e quando não estão ligados a uma molécula de açúcar são chamados agliconas.

Existe uma relação entre a estrutura e a atividade antioxidante (SKINNER; HUNTER, 2013), e as diferenças estruturais entre os flavonoides também resultam em grandes diferenças na biodisponibilidade (MANACH et al., 2009).

Ao contrário dos micronutrientes tradicionais, os compostos fenólicos não são essenciais à nutrição, mas há cada vez mais evidências de que o consumo a longo prazo pode ter efeitos favoráveis sobre a incidência das DCNT (DEL RIO et al., 2013).

Independentemente de sua capacidade antioxidante, estes compostos podem influenciar diretamente as atividades de enzimas como α -glicosidase, α -amilase e lipase pancreática. A inibição da atividade destas enzimas no trato digestivo faz com que a hidrólise de carboidratos e lipídeos seja mais lenta, causando uma redução da taxa de absorção de glicose, inibição da proliferação dos adipócitos e redução da inflamação crônica (ASSINI; MULVIHILL; HUFF, 2013; DJERIDANE et al., 2013; DEVARAJAN; VENUGOPAL, 2012; DAO et al., 2011).

Os mecanismos de ação e os possíveis efeitos dos polifenóis sobre a saúde ainda estão sendo elucidados, o que exige pleno conhecimento sobre a química, a ocorrência em alimentos, os efeitos do processamento, o metabolismo e a biodisponibilidade, representando um grande desafio para os pesquisadores do século XXI (SCALBERT et al., 2011).

1.2. Subprodutos de frutas como fontes de compostos fenólicos

O Brasil ocupa a terceira colocação no *ranking* da produção mundial de frutas, e é responsável por 5,3% de todo o volume colhido, com uma produção de 41,0 milhões de toneladas. A presença brasileira no mercado externo, com a oferta de frutas tropicais e de clima temperado durante boa parte do ano, é possível pela extensão territorial do país, posição geográfica e condições de clima e solo privilegiadas (SEAB/DERAL, 2015).

No Brasil, muitas frutas tropicais comestíveis são transformadas em sucos naturais e concentrados, geleias, polpas e extratos. Este processo gera uma grande quantidade de resíduos. Parte destes resíduos, compostos principalmente por sementes e cascas, é utilizada na elaboração de ração animal, o restante é descartado no solo, podendo causar problemas ambientais (DUZZIONI et al., 2013; O'SHEA; ARENDT; GALLAGHER, 2012; VIUDAMARTOS et al., 2011; YAMANAKA, 2005).

A quantidade de resíduos obtida como resultado do processamento de frutas pode se aproximar ou até mesmo ultrapassar a quantidade de produto final, o que afeta a economia

mundial. Uma possível solução para este problema seria a valorização destes resíduos pelas indústrias, pois, na maioria dos casos, eles apresentam conteúdos semelhantes ou até mesmo mais altos de compostos bioativos do que o produto final. Sendo assim, poderiam ser utilizados como aditivos alimentares naturais, agindo como antioxidantes, antimicrobianos, aromatizantes, corantes e agentes espessantes, já que os aditivos sintéticos possuem resíduos químicos que causam insegurança e preocupação nos consumidores (KAROUI; MARZOUK, 2013; AYALA-ZAVALA et al., 2011; VIUDA-MARTOS et al., 2011; SENDRA et al., 2008).

Os compostos fenólicos presentes em subprodutos de frutas podem não só aumentar a estabilidade dos alimentos, prevenindo a peroxidação de lipídeos, como também podem proteger, em humanos e animais, biomoléculas e estruturas como membranas e ribossomos de danos oxidativos (OLIVEIRA et al., 2009). No entanto, dependendo do tipo de fruta, os resíduos podem conter um teor de umidade elevado, o que poderia contribuir para a degradação em ritmo acelerado. Um dos métodos para conservar as propriedades sensoriais e os compostos bioativos presentes nesses resíduos é a secagem (DUZZIONI et al., 2013). Subprodutos de frutas secos são mais fáceis de transportar, e podem ser utilizados para agregar valor nutricional e aumentar a vida útil de diversos tipos de produtos alimentícios (INFANTE et al., 2013).

A acerola (*Malpighia emarginata* DC) é nativa das Antilhas e América do Sul tropical (MOHAMMED, 2011). O Brasil apresenta condições ideais para o cultivo de acerola, sendo um dos maiores produtores mundiais (PEREIRA et al., 2013). Pertencente à família Malpighiaceae, é um fruto delicado, que mede cerca de 3 a 6 cm de diâmetro (MEZADRI et al., 2008). A forma pode ser redonda, oval ou achatada, e o peso pode variar de 3 a 16 g. A superfície pode ser lisa ou apresentar sulcos rasos ou profundos. Em frutos maduros, a cor da casca pode variar de vermelho-amarelada, vermelho-alaranjada ou vermelha a vermelho-púrpura. A cor da polpa pode ser amarela, alaranjada ou vermelha, e é muito suculenta e refrescante (RITZINGER; RITZINGER, 2011; MEZADRI et al., 2008).

A polpa pasteurizada congelada e o suco pasteurizado são os principais produtos derivados da fruta explorados comercialmente. Acerola não é uma fruta muito atrativa para consumo *in natura*, uma vez que geralmente apresenta sabor ácido e adstringente. Mediante as técnicas de secagem por atomização ou liofilização, o fruto verde é transformado em pó, que pode ser usado como ingrediente nas indústrias alimentícia e farmacêutica (RITZINGER; RITZINGER, 2011).

Conhecida principalmente pelo seu elevado teor de vitamina C, a acerola também é uma das mais importantes fontes naturais de vitamina A. Além disso, contém tiamina, riboflavina, niacina, proteínas e sais minerais (RITZINGER; RITZINGER, 2011; MEZADRI et al., 2008).

Dentre os fitoquímicos encontrados na acerola, destacam-se: procianidina B1, rutina (MEZADRI et al., 2008), quercetina, cianidina, proantocianidinas, catequina, caempferol (BATAGLION et al., 2015; CORREIA et al., 2012) e antocianinas (SOUSA et al., 2011). A capacidade antioxidante da fruta deve-se aos flavonoides e à vitamina C (CORREIA et al., 2012; SOUSA et al., 2011; RUFINO et al., 2010; MEZADRI et al., 2008; RIGHETTO; NETTO; CARRARO, 2005).

A laranja (*Citrus sinensis*), pertencente à família Rutaceae, é o fruto mais cultivado no Brasil. O estado de São Paulo é o principal produtor, com 16,2 milhões de toneladas, cuja participação representa 38,9% do volume total (SEAB/DERAL, 2015; YAMANAKA, 2005). São nativas do sudeste da Ásia, possivelmente da China e da Índia. Sua árvore tem porte médio, que atinge de 5,0 a 10,0 metros de altura. Seus frutos, aromáticos, têm formato oval ou elipsoide, superfície lisa, coloração laranja-claro quando maduros e pesam 190 g em média (LORENZI et al., 2006). Seu suco é abundante, correspondendo de 50 a 55% de seu peso (LANDANIYA, 2008).

As laranjas possuem vitaminas e minerais importantes para a saúde, como vitamina C e ácido fólico (SKINNER; HUNTER, 2013). A fruta é também uma boa fonte de óleos essenciais, carotenoides, flavonoides e fibras (CRIZEL et al., 2013; NIU et al., 2008). Os principais flavonoides encontrados em laranjas são naringenina e hesperetina, pertencentes à subclasse flavanonas (KHAN; ZILL-E-HUMA; DANGLES, 2014; SKINNER; HUNTER, 2013). As cascas de laranjas concentram maiores quantidades de flavanonas, mas estes fenólicos também podem ser encontrados no suco (ESCOBEDO-AVELLANEDA et al., 2014; BARROS et al., 2012; VIUDA-MARTOS et al., 2011; SAWALHA et al., 2009).

Além dos polifenóis, subprodutos de frutas também são ricos em fibras alimentares, tanto solúveis quanto insolúveis (CRIZEL et al., 2013; ABUD; NARAIN, 2009; FERNANDEZ-LOPEZ et al., 2009). Fibras dietéticas, ou fibras alimentares, são definidas como carboidratos não digeríveis e ligninas (encontradas em plantas), e são muito utilizadas pelas indústrias farmacêuticas e alimentícias, devido aos benefícios à saúde que elas proporcionam, como manter sob controle doenças cardiovasculares e diabetes, aliviarem a constipação (AYALA-ZAVALA et al., 2011; ELLEUCH et al., 2011), e até mesmo alterarem

positivamente a microbiota intestinal se combinadas com probióticos (SHEN; ZHAO; TUOHY, 2012). As fibras também são descritas como úteis na produção de alimentos por possuírem atributos tecnológicos que podem fazer com que melhorem as características do produto, tais como: retenção de água, ligação de óleo, viscosidade, textura, características sensoriais, e prazo de validade (BEDANI et al., 2014; O'SHEA; ARENDT; GALLAGHER, 2012; ELLEUCH et al., 2011).

As fibras dietéticas são classificadas como solúveis ou insolúveis, com base em sua capacidade de se misturar com água. As fibras dietéticas solúveis incluem pectinas, gomas, mucilagens e algumas hemiceluloses, enquanto a celulose, outros tipos de hemiceluloses e lignina estão incluídos na fração insolúvel. As fibras insolúveis são caracterizadas pela sua porosidade, sua baixa densidade e pela sua capacidade de aumentar o volume fecal e diminuir o trânsito intestinal. A fração solúvel demonstra maior capacidade de proporcionar viscosidade, capacidade de formar géis e/ou atuar como emulsionante, não tem textura ruim nem mau gosto e é mais fácil de incorporar em alimentos e bebidas processados (ELLEUCH et al., 2011).

1.3. Probióticos, prebióticos e simbióticos

Em 1999, a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) estabeleceu as diretrizes básicas para análise e comprovação de propriedades funcionais e de saúde de alimentos, e considera funcional o alimento que além das funções nutricionais básicas, quando se tratar de nutriente, produza efeitos metabólicos e/ou fisiológicos e/ou efeitos benéficos à saúde, devendo ser seguro para consumo sem supervisão médica (ANVISA, 1999). Ácidos graxos, carotenoides, fibras alimentares, inulina, fitoesteróis, probióticos, entre outros, são considerados pela ANVISA como compostos bioativos com propriedade funcional.

Os consumidores estão cada vez mais interessados em produtos convenientes e promotores de saúde. Por este motivo, os alimentos funcionais representam grande área de estudo em todo o mundo, e um mercado altamente promissor. De acordo com estimativas, o mercado brasileiro de alimentos funcionais cresce cerca de 20% ao ano, sendo que os iogurtes em geral representam 80% do mercado de refrigerados (GALLINA et al., 2011). Nos Estados Unidos, 3,9 milhões de adultos demonstraram usar suplementos probióticos e/ou prebióticos em 2015, um aumento de quatro vezes desde 2007, estando assim entre os suplementos mais comprados pelos consumidores. Considerando que o crescimento global no setor de

suplementos nutricionais desacelerou para 5% em 2014, os probióticos cresceram 14,2%, com quase US\$ 1,4 bilhão em vendas (PARKER et al., 2017).

Probióticos são microrganismos vivos que quando administrados em quantidades adequadas conferem benefícios à saúde do hospedeiro (FAO/WHO, 2002). Os microrganismos probióticos mais estudados e amplamente empregados na indústria pertencem ao grupo das bactérias lácticas, principalmente dos gêneros *Lactobacillus* e *Bifidobacterium* (SAAD; CRUZ; FARIA, 2011). Alguns dos benefícios relacionados ao consumo de probióticos são: homeostase da microbiota intestinal, promoção da integridade da barreira de defesa do intestino, controle das respostas inflamatórias intestinais, alteração do pH local, diminuição da população de patógenos através da produção de ácidos acético e láctico, promoção da digestão da lactose em indivíduos intolerantes à lactose, estimulação do sistema imune, alívio da constipação, aumento da absorção de minerais e produção de vitaminas, redução do risco de diarreia causada por bactérias e vírus (LARSEN et al., 2013; JIRILLO; JIRILLO; MAGRONE, 2012; SAAD, 2006).

Prebióticos são ingredientes alimentares não-digeríveis que estimulam seletivamente o crescimento e/ou atividade de uma ou de um número limitado de bactérias no cólon, melhorando assim a saúde do hospedeiro (ROBERFROID et al., 2010). Entre os principais efeitos exercidos por prebióticos para a manutenção da saúde do hospedeiro estão: estimulação do crescimento e/ou atividade metabólica de bactérias intestinais benéficas que estabilizam a composição da microbiota intestinal, melhoria das funções intestinais (regularidade, volume e consistência das fezes), aumento da absorção de cálcio com melhoria da saúde óssea, modulação da produção gastrointestinal peptídica, metabolismo energético e saciedade, iniciação (após o nascimento) e regulação/modulação das funções imunológicas, redução do risco de infecções intestinais, redução do risco de diabetes tipo 2 e obesidade, redução do risco de câncer de cólon (KNUDSEN et al., 2013; JIRILLO; JIRILLO; MAGRONE, 2012).

Simbiótico é um produto no qual um probiótico e um prebiótico estão combinados. A interação entre eles pode ser favorecida por uma adaptação do probiótico ao substrato prebiótico. Se ambos forem selecionados corretamente, o tempo de sobrevivência e a atividade das bactérias durante o armazenamento do alimento podem ser melhorados, bem como durante sua passagem através do trato gastrointestinal. A modulação da composição microbiana e metabolismo através desta combinação pode ser uma estratégia alimentar para diminuir o risco do desenvolvimento de diversas doenças, como obesidade, diabetes, doença

hepática gordurosa não alcoólica, doença intestinal inflamatória e cânceres (BEDANI; ROSSI; SAAD, 2013; VITALI et al., 2010; SAAD, 2006).

Leites fermentados são produzidos, principalmente, a partir do leite de vaca, cujas proteínas são compostas por 80% de caseína e 20% de proteínas do soro do leite: β -lactoglobulina (50%), α -lactalbumina (20%), proteína sérica do sangue (10%) e imunoglobulinas (10%) (OLIVEIRA et al., 2015; RUPRICHOVÁ et al., 2012). A Instrução Normativa (IN) nº 46 do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) define leites fermentados como produtos adicionados ou não de outras substâncias alimentícias, obtidos por coagulação e diminuição do pH do leite, ou leite reconstituído, adicionado ou não de outros produtos lácteos, por fermentação láctica, mediante ação de cultivos de microrganismos específicos. Estes microrganismos específicos devem ser viáveis, ativos e abundantes no produto final durante seu prazo de validade (MAPA, 2007).

A denominação do produto, que pode ser iogurte, leite fermentado, leite acidófilo, *kefir*, *kumys* e coalhada, será definida através dos cultivos ou microrganismos empregados na fermentação. São considerados leites fermentados os produtos que utilizam um ou vários dos seguintes cultivos para fermentação: *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus casei*, *Bifidobacterium sp*, *Streptococcus salivarius* subsp. *thermophilus* e/ou outras bactérias ácido lácticas que, por sua atividade, contribuem para a determinação das características do produto final (MAPA, 2007).

De acordo com a legislação, a alegação para produtos contendo probióticos deve indicar a espécie do microrganismo presente que contribui para o equilíbrio da microbiota intestinal. Também deve ser declarado que o consumo do produto deve estar associado a alimentação equilibrada e a hábitos de vida saudáveis. A quantidade mínima viável para os probióticos deve estar situada na faixa de 10^8 a 10^9 Unidades Formadoras de Colônias (UFC) na recomendação diária do produto pronto para o consumo, conforme indicação do fabricante. Valores menores podem ser aceitos, desde que a empresa comprove sua eficácia. A comprovação é feita através de um laudo de análise do produto que comprove a quantidade mínima viável do microrganismo até o final do prazo de validade, e pelo teste de resistência da cultura utilizada no produto à acidez gástrica e aos sais biliares (ANVISA, 2008).

1.4. Polifenóis e a microbiota intestinal

A microbiota saudável é definida como a microbiota que conserva e promove o bem-estar e a ausência de doenças, especialmente do trato gastrointestinal (SAAD, 2006). A

homeostase microbiana intestinal contribui para a manutenção de um estado saudável, mediada por um equilíbrio dinâmico entre o hospedeiro e os microrganismos. Este ecossistema microbiano contribui com várias funções importantes para o hospedeiro humano, incluindo proteção contra patógenos, participação na formação da parede intestinal, produção de ácidos graxos de cadeia curta (AGCC), produção de vitaminas (B e K), degradação de xenobióticos, estimulação da angiogênese e modulação da resposta imune intestinal. Idade, sexo, drogas, doenças e dieta do hospedeiro geram transformações na composição da microbiota intestinal (JIRILLO; JIRILLO; MAGRONE, 2012; VITALI et al., 2010).

Tem-se investigado a interação entre compostos fenólicos e a microbiota intestinal, indicando que estes podem inibir microrganismos patogênicos e estimular o crescimento de microrganismos probióticos (HERVERT-HERNÁNDEZ et al., 2009). Um estudo *in vitro* examinou o metabolismo de subprodutos de romã pelas bactérias intestinais. A exposição ao extrato de romã aumentou o crescimento total de *Bifidobacterium spp.* e *Lactobacillus spp.* (BIALONSKA et al., 2010). Yao et al. (2011) mostraram que o extrato de *bayberry* chinês apresentou atividade antibacteriana contra *Salmonella*, *Listeria* e *Shigella*. Martini et al. (2009) encontraram atividade inibitória para a bactéria *Helicobacter pylori* para extrato de folhas de amora preta e para ácido elágico puro.

Estudos têm sido realizados para compreender as transformações de determinados tipos de polifenóis e identificar os microrganismos envolvidos durante a sua fermentação colônica, que variam dependendo da estrutura química (SELMA; ESPIN; TOMAS-BARBERAN, 2009). A microbiota intestinal converte polifenóis em metabólitos com diferentes atividades, e estes interagem diretamente com células imunes (PELUSO; ROMANELLI; PALMERY, 2014). Os efeitos sobre a saúde destes metabólitos dependem, entretanto, da sua biodisponibilidade. Portanto, é importante entender como são absorvidos, metabolizados e eliminados do corpo, a fim de verificar suas ações *in vivo* (DUEÑAS et al., 2015).

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo Geral

Estudar o potencial funcional de subprodutos (resíduos) desidratados de acerola e de laranja como fontes de compostos fenólicos, e desenvolver leites fermentados probióticos adicionados de um dos resíduos.

2.2. Objetivos Específicos

- Caracterizar os resíduos desidratados de acerola e de laranja quanto à composição físico-química e potencial funcional como fontes de compostos fenólicos;
- Desenvolver leites fermentados suplementados com bactérias probióticas (*Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* Bb-12 e *Lactobacillus acidophilus* La-5) e adicionados de resíduo desidratado em diferentes concentrações;
- Determinar os parâmetros físico-químicos e microbiológicos dos leites fermentados durante o armazenamento sob refrigeração (4 ± 1 °C) por até 28 dias;
- Avaliar viabilidade e resistência das cepas probióticas e dos compostos fenólicos dos leites fermentados sob condições gastrointestinais simuladas *in vitro*.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Obtenção e preparo dos resíduos de acerola e de laranja

Os resíduos de acerola (RA) foram fornecidos pela empresa Sítio do Bello® (Paraibuna, São Paulo), especializada no plantio, processamento e distribuição de frutas típicas do Brasil. Os resíduos de laranja (RL) foram fornecidos por Cutrale® (Araraquara, São Paulo), indústria especializada na produção de suco de laranja.

Ambos os resíduos foram preparados da mesma forma. Primeiramente, passaram pelo processo de branqueamento, ou seja, foram imersos em água potável fervente por aproximadamente 10 minutos. Os resíduos foram transferidos para bandejas de secagem e desidratados em estufa de ventilação forçada a 60 °C por 24 horas. Após a secagem, foi realizada a trituração, primeiramente em liquidificador semi-industrial e, posteriormente, em liquidificador doméstico. Em seguida, o material foi tamisado, até a obtenção de pós com diâmetros inferiores a 0,42 mm. Posteriormente, os pós obtidos foram embalados em sacos plásticos de polipropileno (PP) e armazenados sob congelamento a -18 ± 2 °C. A **Figura 1** mostra o resíduo de acerola “in natura” e após obtenção do pó.

Figura 1. Subprodutos de acerola *in natura* (A), e após secagem e trituração (B).

3.2. Determinação da composição físico-química dos resíduos desidratados de acerola e de laranja

3.2.1. Composição centesimal e valor energético total (VET)

A determinação da umidade das amostras foi realizada gravimetricamente em estufa a vácuo a 70 °C (AOAC, 2005). Para isso, foram pesados 3 g de amostra em cápsulas de alumínio, previamente taradas e secas. As cápsulas foram colocadas em estufa a 70 °C,

retiradas e pesadas novamente, até peso constante (aproximadamente 7 horas). A determinação foi realizada em triplicata, e os resultados foram expressos como g por 100 g em base úmida (b.u.), na forma de média $\pm$ desvio padrão.

A determinação de cinzas foi realizada por incineração em mufla a 550 °C (AOAC, 2005). Para isso, foram pesados 3 g de amostra em cadinhos de porcelana, previamente tarados e secos. Os cadinhos ficaram na mufla a 550 °C por 8 horas seguidas, e após uma hora em dessecador foram pesados. A determinação foi realizada em triplicata, e os resultados foram expressos como g por 100 g (b.u.), na forma de média $\pm$ desvio padrão.

O conteúdo proteico das amostras foi determinado pelo método de micro-Kjeldahl, utilizando o fator 6,25 para conversão de nitrogênio em proteína (AOAC, 2005). A análise foi realizada em triplicata, e os resultados foram expressos como g por 100 g (b.u.), na forma de média $\pm$ desvio padrão.

O teor de lipídeos foi determinado por extração em Soxhlet (AOAC, 2005), utilizando-se éter de petróleo como solvente, sob refluxo. Para este estudo, 3 g de amostra ficaram no extrator por 10 horas. A análise foi realizada em triplicata, e os resultados foram expressos como g por 100 g (b.u.), na forma de média $\pm$ desvio padrão.

A quantidade de carboidratos, exceto fibras, foi estimada através de cálculo feito pela diferença entre 100 e as quantidades já determinadas de umidade, cinzas, proteínas, lipídeos e fibras. Os resultados foram expressos como g por 100 g (b.u.), na forma de média $\pm$ desvio padrão.

O VET foi determinado considerando-se os fatores de conversão propostos pela FAO/WHO (2002), específicos para frutas: 3,36 Kcal/g (quilocalorias por grama) de proteína, 3,60 Kcal/g de carboidrato (incluindo fibras) e 8,37 Kcal/g de lipídeo. Os resultados foram expressos como Kcal por 100 g (b.u.), na forma de média.

3.2.2. Fibras alimentares totais (FAT)

A determinação de FAT dos resíduos foi determinada pelo método gravimétrico não enzimático da AOAC (2005). Para isso, 0,25 g do resíduo de acerola e 0,30 g do resíduo de laranja foram solubilizados em água destilada a 37 °C, durante 90 minutos. Transcorrido este tempo, adicionou-se a cada amostra 100 mL de etanol a 95%, ficando à temperatura ambiente por 60 minutos. O material resultante foi filtrado à vácuo em cadinho poroso (n° 2) contendo 1 g de lã de vidro (marca Synth®). O resíduo, lavado sequencialmente com 40 mL de etanol a 78%, 20 mL de etanol a 95% e 10 mL de acetona, foi seco em estufa a 105 °C por 2 horas,

esfriado em dessecador e pesado. Nos resíduos contidos nos cadinhos foram determinados a seguir o teor de nitrogênio, pelo método de Kjeldahl ($N \times 6,25$), e o teor de cinzas, segundo a AOAC (2005). A análise foi realizada em quadruplicata, e os resultados foram expressos em g por 100 g (b.u.), na forma de média $\pm$ desvio padrão.

3.2.3. Vitamina C

A determinação do teor de vitamina C foi realizada segundo Plaza et al. (2011), com modificações. Para isso, a amostra (0,2 g) foi homogeneizada com 25 mL de solução extratora (3% de ácido metafosfórico e 8% de ácido acético) por 15 minutos. A mistura foi centrifugada, filtrada à vácuo e seu volume foi ajustado para 50 mL. A amostra foi filtrada através de um filtro de membrana de 0,45 μ m (Millipore Ltd., Bedford, MA) e em seguida analisada por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE). Uma alíquota de 0,5 mL da solução foi diluída com 3 mL de solução de ditiotreitol (20 mg/mL) (Sigma, St. Louis, EUA) e essa mistura ficou por 2 horas em repouso, protegida da luz. Durante este tempo, ocorre a redução de ácido dehidroascórbico para ácido ascórbico. Após este período, a mistura foi filtrada e analisada por CLAE. A análise foi realizada em triplicata, e os resultados foram expressos como g por 100 g (b.u.), na forma de média $\pm$ desvio padrão.

3.2.4. Composição de minerais

A determinação de potássio (K), cálcio (Ca), cobre (Cu), ferro (Fe), magnésio (Mg), fósforo (P) e zinco (Zn) foi realizada em espectrômetro ótico de emissão atômica com plasma indutivamente acoplado (ICP OES, Radial, marca Spectro, modelo Arcos), através da digestão das amostras utilizando-se ácido nítrico concentrado, peróxido de hidrogênio 30% e aquecimento em forno de micro-ondas. A análise foi realizada em duplicata, e os resultados foram expressos como mg por 100 g (b.u.).

3.2.5. Obtenção dos extratos metanólicos dos resíduos

As amostras foram extraídas com metanol aquoso a 70% na proporção de 1:30 (m/v), com agitador magnético e barra magnética por 1 hora em temperatura ambiente (NÓBREGA et al., 2015). A solução foi centrifugada a 11510 g por 15 minutos a 10 °C, e o sobrenadante foi filtrado em papel de filtro Whatman nº 6. O filtrado foi transferido para balão volumétrico,

e seu volume final foi aferido para 50 mL. Cada extrato continha, portanto, 1 g de amostra para 50 mL de solvente.

3.2.6. Compostos fenólicos totais

O teor de compostos fenólicos totais foi determinado de acordo com o método de Singleton, Orthofer e Lamuela-Raventos (1999), com modificações descritas a seguir. Alíquotas de 0,25 mL dos extratos metanólicos 70% foram adicionadas de 2 mL de água destilada e 0,25 mL do reagente de Folin-Ciocalteu. Após 3 minutos a temperatura ambiente, adicionaram-se 0,25 mL de solução saturada de carbonato de sódio. Os tubos foram levados a banho-maria a 37 °C por 30 minutos, para desenvolvimento da coloração azulada característica desse reagente.

Um espectrofotômetro (HITASHI, mod. U-1100) foi utilizado para leitura das absorbâncias a 750 nm. As análises foram realizadas em triplicata, e os resultados expressos em µg equivalente de ácido gálico (EAG) por g de amostra em base seca (b.s.), na forma de média ± desvio padrão.

3.2.7. Proantocianidinas totais

A determinação de proantocianidinas totais foi realizada de acordo com Porter, Hrstich e Chan (1986), com modificações. Alíquotas de 0,25 mL dos extratos metanólicos 70% foram adicionadas de 2,5 mL de solução de n-butanol/HCl/FeSO₄.7H₂O. Os tubos foram tampados e aquecidos em banho-maria a 95 °C por 15 minutos. Um espectrofotômetro (HITASHI, mod. U-1100) foi utilizado para leitura das absorbâncias a 540 nm. A curva-padrão utilizada foi de cianidina-3-rutinosídeo (0,25 mg/mL) (Extrasynthese - Genai, França), e os resultados foram expressos em mg equivalente de cianidina (EC) por g de amostra (b.s.), na forma de média ± desvio padrão.

3.2.8. Capacidade antioxidante *in vitro*

Sequestro do radical DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazil)

A capacidade antioxidante *in vitro* foi determinada através da redução do radical estável DPPH• (2,2-difenil-1-picrilhidrazil) pelos antioxidantes presentes nas amostras,

segundo descrito por Brand-Williams, Cuevelier e Berset (1995) com algumas modificações (DUARTE-ALMEIDA et al., 2006). Foi preparada uma solução metanólica de DPPH• (0,05 mM) de forma a apresentar aproximadamente 0,4 de absorbância em 517 nm de comprimento de onda. As determinações foram realizadas em microplaca de poliestireno com 96 cavidades (Costar, Cambrigde, MA) para uso em comprimento de onda entre 340 e 800 nm. Em cada cavidade foram adicionados 250 µL da solução de DPPH•, 50 µL de metanol para o grupo controle, o mesmo volume para a solução-padrão de Trolox (6-hidróxi-2, 5, 7, 8-tetrametil-2-ácido carboxílico, Sigma Chemical Co., St. Louis, EUA) e para os extratos obtidos das amostras, adequadamente diluídos, quando necessário. A reação foi mantida a temperatura ambiente por 20 minutos, no escuro. As leituras das absorbâncias foram realizadas em 517 nm em espectrofotômetro de microplaca Benchmark Plus (Synergy™ H1, Biotek Instruments Inc., Vermont, EUA).

A absorbância das amostras correlacionada à absorbância do controle resulta na porcentagem de sequestro de radicais livres. A curva de calibração foi preparada com uma solução de Trolox (Sigma Chemical Co., St. Louis, EUA) nas concentrações de 20 a 80 mM, e os resultados foram expressos em µmoles equivalentes de trolox (ET) por g de amostra (b.s.), na forma de média ± desvio padrão. As análises foram realizadas em triplicata.

Poder redutor do ferro (FRAP)

O poder de redução do ferro foi determinado segundo Benzie e Strain (1996). Adicionaram-se 20 µL dos extratos já diluídos em microplaca de poliestireno com 96 cavidades (Costar, Cambrigde, MA). Em seguida, foram adicionados 150 µL do reagente FRAP (tampão acetato de sódio/solução de TPTZ/ solução de HCl), e após 5 minutos de incubação a 37 °C, as absorbâncias foram lidas a 593 nm em espectrofotômetro de microplaca Benchmark Plus (Synergy™ H1, Biotek Instruments Inc., Vermont, EUA). Os resultados foram expressos em µmoles equivalentes de trolox (ET) por g de amostra (b.s.), na forma de média ± desvio padrão. As análises foram realizadas em triplicata.

Capacidade de absorção de radicais de oxigênio (ORAC)

A determinação da ORAC foi realizada segundo a metodologia descrita por Prior et al. (2003). As determinações foram realizadas em microplaca de poliestireno com 96 cavidades (Costar, Cambrigde, MA). Em cada cavidade foram adicionados 250 µL do extrato, adequadamente diluído. O equipamento (espectrofotômetro Synergy™ H1, Biotek

Instruments Inc., Vermont, EUA) injeta automaticamente 150 µL de fluoresceína (Sigma, St. Louis, EUA) (40 nM), seguido de incubação de 30 minutos. Após esse período, 25 µL de solução de AAPH (Wako, Richmond, EUA) (153 mM) foram injetadas para dar início à reação. A fluorescência foi monitorada a cada minuto, durante uma hora, a 37 °C.

A capacidade antioxidante *in vitro* foi determinada pela perda de fluorescência das proteínas versus a concentração de antioxidante. A leitura das absorbâncias foi realizada a 493 nm, e os resultados foram expressos em µmoles equivalentes de trolox (ET) por g de amostra (b.s.), na forma de média ± desvio padrão. As análises foram realizadas em triplicata.

3.2.9. Perfil de flavonoides por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE)

Para identificação dos principais flavonoides presentes nos subprodutos desidratados, primeiramente as amostras foram extraídas com metanol aquoso a 70% na proporção de 1:30 (m/v), utilizando-se ultra-turrax na velocidade 7, em intervalos de 1 minuto por 3 vezes. Os extratos obtidos foram filtrados utilizando-se papel de filtro Whatman nº 6. O filtrado foi reextraído 2 vezes com mais 15 mL de solvente, em intervalos de 1 minuto. Para concentração dos extratos utilizou-se Rotaevaporador (RE 120 - Büchi), em temperaturas de banho de 40°C (até ~ 2 mL). As amostras concentradas, livres de metanol, tiveram então seu volume ajustado com água para balão volumétrico de 10 mL. Colunas contendo 4 g de poliamida (PA) (Resina de Poliamida CC6, marca Macherey-Nagel, tamanho de partícula 0,10-0,30 mm) foram pré-condicionadas pela passagem de 20 mL de metanol e 60 mL de água destilada. Os extratos aquosos foram aplicados nas colunas, para concentração dos compostos fenólicos e eliminação de interferentes. Após a passagem dos extratos, as colunas foram lavadas várias vezes com água destilada (300 mL no total), e a eluição dos flavonoides foi feita com metanol, e com metanol:amônia (95,5:0,5), separadamente. Após secagem completa através de rotaevaporação, as amostras foram ressuspensas em 2 mL de metanol grau HPLC e filtradas utilizando-se filtros de polietileno com membrana PTFE (Millipore Ltd., Bedford, MA) de 0,22 µm de poro. As extrações foram realizadas em duplicata.

A separação dos flavonoides via CLAE foi realizada em coluna Prodigy 5µ ODS (3) 250 x 4,60 mm (Phenomenex Ltd, Reino Unido), de acordo com Arabbi, Genovese e Lajolo (2004). Utilizou-se um gradiente de solventes constituído por: (A) Água: Tetrahydrofurano: Ácido trifluoroacético (98:2:0,1) e (B) Acetonitrila. A proporção do solvente B foi crescente e nas seguintes proporções, 17% por 2 min, 25% por 5 min, 35% por 8 min e 50% por 5 min,

em fluxo de 1 mL/min a 25 °C. Para limpeza da coluna, foi alterada a porcentagem inicial do solvente B para 90% e a seguir re-equilibrada nas condições iniciais por 10 min. Utilizou-se o cromatógrafo líquido Hewlett Packard série 1100, constituído por injetor automático de amostras, bomba quaternária e detector de arranjo de diodo (DAD) (Palo Alto, EUA), controlados pelo software Chem Station. As amostras foram injetadas em duplicata e os polifenóis foram identificados através da comparação de tempo de retenção e espectro com os padrões da Sigma Chemicals Co. (St. Louis, USA).

3.3. Produção de leites fermentados probióticos adicionados de resíduo desidratado de acerola

Foram produzidas quatro diferentes formulações de leites fermentados probióticos, em triplicata. A cultura probiótica utilizada foi a ABT-4 (Christian Hansen, Hørsholm, Dinamarca), constituída dos seguintes microorganismos: *Bifidobacterium animalis* subsp *lactis* Bb-12, *Lactobacillus acidophilus* La-5 e *Streptococcus thermophilus* (cultura starter).

O leite de vaca UHT (Molico®) foi aquecido até 80 °C, adicionando-se em seguida o leite desnatado em pó (Molico®), o edulcorante sucralose (Linea®) e o pó de subprodutos de acerola. A mistura foi homogeneizada e aquecida até 95 °C por 5 min, em seguida resfriada em banho de gelo até atingir 37 °C, para que a cultura pudesse ser adicionada. A fermentação ocorreu à temperatura de 37 °C em estufa, até um valor de pH de 4,8, de modo a garantir que o valor de pH durante o armazenamento seja em torno de 4,5. As quatro formulações foram levadas ao refrigerador (4 ± 1 °C), e lá ficaram durante 24 h. Porções de 20 g de cada formulação foram envasadas em potes plásticos de polipropileno próprios para alimentos, selados com tampas de metal, sendo em seguida armazenados sob refrigeração (4 ± 1 °C) durante 28 dias (**Figura 2**). A proporção dos ingredientes empregados nas quatro formulações é apresentada na **Tabela 1**.

Figura 2. Fluxograma do processo de fabricação dos leites fermentados probióticos.

Tabela 1. Proporção dos ingredientes empregados na elaboração das quatro formulações de leites fermentados.

Ingredientes (g/100 mL de leite de vaca UHT)	Formulações			
	F0	F2	F5	F10
Leite de vaca em pó desnatado	2,5	2,5	2,5	2,5
Edulcorante sucralose	0,1	0,1	0,1	0,1
Cultura ABT-4	0,5	0,5	0,5	0,5
Resíduo de acerola (RA)	0,0	2,0	5,0	10,0

F0: sem adição de RA; F2: 2% de RA; F5: 5% de RA; F10: 10% de RA.

3.4. Determinação da composição físico-química e microbiológica dos leites fermentados durante o armazenamento sob refrigeração (4 ± 1 °C; 28 dias)

3.4.1. Composição centesimal e valor energético total (VET)

A determinação da umidade das amostras foi realizada em estufa a 105 °C até peso constante (AOAC, 2005). Para isso, foram pesados 5 g de amostra em cápsulas de porcelana,

previamente taradas e secas. As cápsulas foram colocadas em estufa a 105 °C, retiradas e pesadas novamente, até peso constante. As análises foram realizadas a partir de amostras mantidas congeladas, de dois diferentes lotes, em triplicata, e os resultados foram expressos como g por 100 g em base úmida (b.u.), na forma de média $\pm$ desvio padrão.

A determinação de cinzas foi realizada por incineração em mufla a 550 °C (AOAC, 2005), a partir de amostras de dois lotes mantidas congeladas. Para isso, foram pesados 3 g de amostra em cadinhos de porcelana, previamente tarados e secos. Os cadinhos ficaram na mufla a 550 °C por 8 horas seguidas, e após uma hora em dessecador foram pesados. A determinação foi realizada em triplicata, e os resultados foram expressos como g por 100 g (b.u.), na forma de média $\pm$ desvio padrão.

O conteúdo proteico das amostras foi determinado pelo método de micro-Kjeldahl, utilizando o fator 6,25 para conversão de nitrogênio em proteína (AOAC, 2005). A análise foi realizada em quadruplicata, a partir de dois lotes mantidos congelados (duas amostras de cada lote para cada formulação), e os resultados foram expressos como g por 100 g (b.u.), na forma de média $\pm$ desvio padrão.

Para a análise de lipídeos utilizou-se o método 963.15 da AOAC (2005). Para isso, foram pesados 5 g de amostra em béqueres de 100 mL. Adicionou-se 60 mL de ácido clorídrico, algumas pérolas de vidro e tampou-se com vidro de relógio. Aqueceu-se até a fervura, mantendo por mais 30 minutos. Após lavar o vidro de relógio com 100 mL de água fervente, filtrou-se a solução em papel de filtro, lavando várias vezes o béquer e o resíduo do papel com água quente (90-95 °C), até que o filtrado exibisse reação neutra (pH neutro). Em seguida, colocou-se o resíduo sobre um vidro de relógio, contendo um papel de filtro seco, e secou-se na estufa a 105 °C. Após a secagem, transferiu-se as amostras para o Soxhlet, extraíndo-se, sob aquecimento, com 250 mL de éter de petróleo durante aproximadamente 4 horas. A análise foi realizada em quadruplicata, a partir de 2 lotes mantidos congelados (duas amostras de cada lote para cada formulação), e os resultados foram expressos como g por 100 g (b.u.), na forma de média $\pm$ desvio padrão.

A quantidade de carboidratos totais, incluindo fibras, foi estimada através de cálculo feito pela diferença entre 100 e as quantidades já determinadas de umidade, cinzas, proteínas, lipídeos. Os resultados foram expressos como g por 100 g (b.u.), na forma de média.

O VET foi determinado considerando-se os fatores de conversão propostos pela FAO/WHO (2002), específicos para leite e derivados: 4,27 Kcal/g (quilocalorias por grama) de proteína, 3,87 Kcal/g de carboidrato e 8,79 Kcal/g de lipídeo. Para estimar a quantidade de

fibras dos leites fermentados, a fim de incluir na determinação do VET, foi utilizada a quantidade encontrada para o RA (62%), e o fator de conversão 2,00 Kcal/g (FAO/WHO, 2002). Os resultados foram expressos como Kcal por 100 g (b.u.), na forma de média.

3.4.2. pH

O pH das quatro formulações foi determinado em dois lotes, em triplicata. Foram aferidos no dia seguinte à fabricação (dia 1) e após 7, 14, 21 e 28 dias de armazenamento. O pHmetro utilizado foi o Orion, modelo Three Stars (Thermofisher Scientific, Waltham, MA, EUA), equipado com eletrodo tipo penetração, modelo 2A04-GF (Analyser, São Paulo, Brasil). Os resultados foram expressos na forma de média $\pm$ desvio padrão.

3.4.3. Acidez titulável

A acidez titulável de cada formulação foi determinada em dois lotes, em triplicata, no dia seguinte à fabricação (dia 1) e após 14 e 28 dias de armazenamento, partindo de amostras mantidas congeladas. Após pesar 2 g da amostra em béquer de 50 mL, adicionou-se 10 mL de água destilada e, após homogeneização, 4 a 5 gotas do indicador (neste caso, fenolftaleína). Titulou-se com solução de hidróxido de sódio 0,1 N sob agitação, até ponto final detectável pelo aparecimento de coloração rósea persistente por aproximadamente 30 segundos ou pH 8,3. Os resultados foram expressos em mg de ácido láctico/g de amostra, na forma de média $\pm$ desvio padrão.

3.4.4. Viabilidade das culturas starter e probióticas

A viabilidade das cepas probióticas e da cultura starter foi analisada com 1, 7, 14, 21 e 28 dias de armazenamento, em dois diferentes lotes. Porções de 1 mL das amostras de leites fermentados, em duplicata, foram coletadas de forma asséptica, homogeneizadas com água peptonada 0,1% (diluição 10⁻¹), utilizando-se mixer. Diluições decimais subsequentes foram preparadas, utilizando o mesmo diluente. Para a determinação das populações de *Lactobacillus acidophilus* La-5 foram realizadas sementeiras em ágar MRS modificado e incubadas a 37 °C por 48 h em aerobiose. A determinação das populações de *Bifidobacterium animalis* subsp *lactis* Bb-12 foi realizada por sementeira em ágar MRS suplementado com

propionato de sódio (3 g/L) e cloreto de lítio (2 g/L) e incubados a 37 °C por 48 h em anaerobiose (LAPIERRE; UNDELAND; COX, 1992). Paralelamente foram avaliadas as populações de *Streptococcus thermophilus* pelo método de semeadura em ágar M17 suplementado com solução de lactose 10% e incubados a 37 °C por 48 h em aerobiose (RICHTER; VEDAMUTHU, 2001). Os resultados foram expressos como média de log UFC/g $\pm$ desvio padrão.

3.4.5. Compostos fenólicos totais

Os extratos metanólicos dos leites fermentados foram obtidos segundo Nóbrega et al. (2015), com algumas modificações. As amostras das quatro formulações, de dois diferentes lotes, foram extraídas em triplicata com metanol P.A., na proporção de 10:10 (m/v), com auxílio de barra magnética por 1 hora em temperatura ambiente. A solução foi centrifugada a 11510 g por 15 minutos a 10 °C, e o sobrenadante foi transferido para balão volumétrico, e seu volume final foi aferido para 20 mL. Cada extrato continha, portanto, 10 g de amostra para 20 mL de solvente.

O teor de compostos fenólicos totais foi determinado de acordo com o método de Singleton, Orthofer e Lamuela-Raventos (1999), com modificações. Alíquotas de 0,25 mL dos extratos metanólicos 70% foram adicionadas de 2 mL de água destilada e 0,25 mL do reagente de Folin-Ciocalteu. Após 3 minutos a temperatura ambiente, adicionaram-se 0,25 mL de solução saturada de carbonato de sódio. Os tubos foram levados a banho-maria a 37 °C por 30 minutos, para desenvolvimento da coloração azulada característica. Um espectrofotômetro (HITASHI, mod. U-1100) foi utilizado para leitura das absorbâncias a 750 nm. As análises foram realizadas em triplicata, e os resultados expressos em μ g equivalente de ácido gálico (EAG) por g de amostra em base úmida (b.u.), na forma de média $\pm$ desvio padrão.

3.4.6. Cor instrumental

Os parâmetros de cor foram avaliados em dois diferentes lotes, nas quatro formulações, em triplicata. As análises foram realizadas no dia seguinte à fabricação dos leites fermentados (dia 1) e após 14 e 28 dias, utilizando-se um espectrofotômetro de refletância (Color Quest XE, Hunter Lab, Fairfax, VA, EUA). A calibração foi feita utilizando-se placas

de calibração em preto e branco fornecidas com o instrumento. Os resultados foram expressos de acordo com o sistema de cores CIELAB (L^* = luminosidade; a^* e b^* = coordenadas de cromaticidade), como média $\pm$ desvio padrão.

3.4.7. Textura instrumental

Os perfis de textura das formulações foram determinados em dois diferentes lotes, no dia seguinte à fabricação (dia 1) e após 14 e 28 dias, em quintuplicata, através de teste de dupla-penetração, utilizando cilindro de acrílico com 25 mm de diâmetro, distância e velocidade de 10 mm e 1 mm/s respectivamente, em analisador de textura TA-XT2 (Stable Micro Systems, Haslemere, Inglaterra). Os atributos analisados foram firmeza (N), adesividade (N s), coesividade, elasticidade e gomosidade (N), coletados através do programa “Texture Expert for Windows” (Stable Micro Systems). Os resultados foram expressos na forma de média $\pm$ desvio padrão.

3.5. Simulação *in vitro* das condições gastrointestinais e viabilidade das cepas probióticas dos leites fermentados

A simulação *in vitro* das condições gastrointestinais foi realizada no terceiro lote, em amostras das quatro formulações de leites fermentados, com 7 e 28 dias de armazenamento. A metodologia empregada foi a de Liserre, Ré e Franco (2007), com modificações descritas por Buriti, Castro e Saad (2010) e utilizando valores de pH de ~2,5 para a fase gástrica, ao invés de pH de ~1,5.

Porções de 25 g dos leites fermentados, em triplicata, foram homogeneizadas com 225 mL de solução salina NaCl 0,85% (m/v). Foram retiradas alíquotas de 30 mL de cada uma das diluições dos leites fermentados, transferindo para 3 frascos estéreis cada uma, totalizando 9 frascos contendo as amostras. O mesmo foi realizado para as quatro formulações.

O pH das soluções foi ajustado a 2,07-2,72 com solução de HCl 1N. Soluções de pepsina (Sigma-Aldrich, EUA) e lipase (Amano Lipase G, Sigma-Aldrich, EUA) foram adicionadas às amostras em concentração de 3 g/L e de 0,9 mg/L, respectivamente. Os frascos foram incubados a 37 °C, em banho de água com agitação constante de aproximadamente 150 rpm (Banho Metabólico Dubnoff MA-095, Marconi, Piracicaba, Brasil), durante 2 horas (fase gástrica).

Após as 2 horas de incubação, o pH foi ajustado para 4,21-5,03, com a adição de solução alcalina pH ~ 12, juntamente com bile (Bile bovina, Sigma-Aldrich, EUA) e pancreatina (Sigma-Aldrich, EUA), em concentração de 10 g/L e 1 g/L, respectivamente. As amostras foram novamente incubadas a 37°C por 2 horas (fase entérica 1).

Ao final de 4 horas de incubação, o pH foi novamente ajustado para 6,12-6,97 com a solução alcalina pH ~ 12. As concentrações de bile e pancreatina foram mantidas. As amostras foram incubadas novamente a 37 °C por 2 horas, em constante agitação (fase entérica 2), totalizando, assim, 6 horas de ensaio.

Ao final de cada fase do ensaio, foram realizadas diluições decimais subsequentes e sementeiras, como descrito no **item 3.4.4**, para posterior contagem de *L. acidophilus* La-5 e *B. animalis* subsp *lactis* Bb-12, a fim de verificar a viabilidade destas culturas probióticas durante e após a digestão simulada *in vitro*.

3.6. Identificação e quantificação de flavonoides dos leites fermentados após simulação *in vitro* das condições gastrointestinais

Para avaliar o possível impacto das condições gastrointestinais sobre os compostos fenólicos dos leites fermentados F2, F5 e F10, foram coletadas alíquotas de 20 mL de todas as amostras diluídas, antes da digestão *in vitro* começar, e após as fases gástrica e entérica 2. Após centrifugação a 11510 g por 60 minutos a 4 °C, os sobrenadantes foram passados por colunas de Poliamida SC6 (1 g) (Macherey-Nagel GmbH Co., Düren, Alemanha), previamente condicionadas com 20 mL de metanol e 60 mL de água destilada. Após a passagem, as colunas foram lavadas várias vezes com água destilada, e a eluição dos flavonoides foi feita com metanol. Após secagem completa através de rotaevaporação, as amostras foram ressuspensas em 1 mL de metanol grau HPLC e filtradas utilizando-se filtros de polietileno com membrana PTFE (Millipore) de 0,22 µm de poro. A identificação e quantificação dos principais flavonoides foi realizada de acordo com Arabbi, Genovese e Lajolo (2004), via CLAE, sendo que alguns picos foram quantificados a 270 nm, e outros a 370 nm, sempre comparando com os padrões de Sigma Chemicals Co. (St. Louis, USA). Os resultados foram expressos em µg/g de leite fermentado.

3.7. Análise estatística dos dados

Os dados foram submetidos aos testes de Shapiro-Wilk e Bartlett/Hartley, a fim de verificar os pressupostos de normalidade e homocedastividade, respectivamente. Em seguida, foram submetidos à análise de variância (One Way ANOVA) e, para comparação das médias, foi utilizado o teste de Tukey. Os dados que não apresentaram homocedastividade foram submetidos a testes não paramétricos de Kruskal-Wallis, e para comparação das médias, utilizou-se o teste Fisher LSD. Em todos os testes estatísticos utilizados, considerou-se um nível de significância de 5%. O programa utilizado como apoio foi o *Statistica* versão 12.0 (StatSoft, Tulsa, EUA).

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Caracterização físico-química dos resíduos desidratados de acerola (RA) e de laranja (RL)

4.1.1. Composição centesimal, VET e teores de vitamina C, fibras totais e composição de minerais

A composição centesimal dos resíduos desidratados de acerola e de laranja, o valor energético total (VET) e os teores de vitamina C e fibras totais, são apresentados na **Tabela 2**. Ambos os resíduos apresentaram elevado teor de fibras alimentares totais e valor energético total similar. Os teores de proteínas das amostras podem ser considerados elevados, e não diferiram significativamente ($p < 0,05$). Com relação à umidade, cinzas e lipídeos, os valores encontrados foram baixos, conforme esperado. Foi detectado elevado teor de vitamina C no resíduo de acerola (RA), ausente no resíduo de laranja (RL).

Tabela 2. Composição centesimal, valor energético total (VET), teor de vitamina C e teores de fibras dos resíduos desidratados de acerola (RA) e de laranja (RL).

	RA	RL
VET (Kcal)	347	336
Umidade (g)	$2,5 \pm 0,0^a$	$6,2 \pm 0,1^b$
Cinzas (g)	$2,5 \pm 0,0^a$	$3,2 \pm 0,0^b$
Proteínas (g)	$10,4 \pm 1,2^a$	$9,9 \pm 1,7^a$
Lipídeos (g)	$1,6 \pm 0,0^a$	$2,6 \pm 0,0^b$
Carboidratos (g)	$21,0 \pm 0,1^a$	$12,1 \pm 1,6^b$
Vitamina C (mg)	605 ± 28	nd
Fibras alimentares totais (g)	$62 \pm 1,4^a$	$66 \pm 1,2^b$

Resultados expressos como média $\pm$ desvio padrão (DP), exceto VET (apenas média). Letras diferentes na mesma linha mostram que existe diferença significativa ($p < 0,05$) entre as amostras. nd: não detectado.

A vitamina C é uma vitamina hidrofílica, presente em frutas e hortaliças. É essencial às funções fisiológicas do corpo, pois participa de diversos processos metabólicos, como no desenvolvimento de tecidos, síntese de colágeno, conversão do colesterol em ácidos biliares, inativação de radicais livres (CHEBROLU et al., 2012; SANCHO; YAHIA; GONZÁLEZ-

AGUILAR, 2011, COZZOLINO, 2009). A Ingestão Diária Recomendada (IDR) de vitamina C para adultos é de 45 mg/dia (ANVISA, 2005). A principal forma biologicamente ativa de vitamina C é o ácido ascórbico (AA), mas a sua forma irreversivelmente oxidada, o ácido dehidroascórbico (DHA), também apresenta atividade de vitamina e, portanto, deve ser determinado, para que se consiga uma estimativa total do teor de vitamina C de um alimento (CARDOSO et al., 2011).

A laranja pera é considerada fonte de vitamina C, contendo aproximadamente 54 mg em 100 g de parte comestível (TACO, 2011). Porém, não foi detectada vitamina C no RL. Como este composto é muito instável, pode ter sofrido perdas durante o processamento dos resíduos, por diversos fatores, como exposição à luz, oxigênio, temperatura, e presença de outros componentes como íons metálicos (COZZOLINO, 2009). Marín et al. (2007) analisaram subprodutos cítricos, provenientes da indústria. Secaram e trituraram estes resíduos, e compararam os resultados de antes e depois do processamento. Em todas as amostras estudadas houve perdas de fibras dietéticas solúveis, flavonoides e atividade antioxidante, e a vitamina C praticamente desapareceu.

O RA apresentou elevado teor de vitamina C (605 mg/100 g). Acerola é uma fruta muito rica em vitamina C. De acordo com a Tabela Brasileira de Composição de Alimentos (TACO, 2011), acerolas possuem 941 mg/100 g desta vitamina. Valores ainda maiores de vitamina C foram encontrados por Cardoso et al. (2011), que compararam o conteúdo de AA de acerolas cultivadas orgânica e convencionalmente (4023 e 2294 mg/100 g, respectivamente). Então, mesmo com o processamento que sofreram, o resíduo desta fruta não perdeu totalmente a vitamina C.

Outros autores analisaram o conteúdo de vitamina C em resíduos da produção de polpa de acerola. Sousa et al. (2011) encontraram um valor bem abaixo (89 mg/100 g) do encontrado no presente estudo. Em contrapartida, Correia et al. (2012) detectaram teor bem acima (2.748 mg/100 g). Em outro estudo, utilizando a mesma temperatura de secagem (60 °C), porém em menos tempo (2,25 horas), os autores encontraram teor de vitamina C de 126 mg/100 g (DUZZIONI et al., 2013). Estas diferenças no teor de vitamina C entre os estudos podem ser explicadas pelo modo de plantio, de colheita e de armazenamento dos frutos, assim como pelo modo de produção das polpas, o tipo e temperatura de secagem utilizados para os resíduos, o tempo de manipulação e o modo de armazenamento. O método utilizado para quantificação também influencia no resultado. A análise de vitamina C por CLAE tem sido

muito utilizada entre os pesquisadores, devido à sua alta sensibilidade (CHEBROLU et al., 2012; COZZOLINO, 2009).

Os resíduos estudados apresentaram elevados teores de fibras alimentares totais (FAT) (RA: 62%; RL: 66%), podendo ser considerados fontes importantes de fibras dietéticas. Resultados semelhantes foram reportados por outros autores, que também analisaram o conteúdo de FAT em resíduos oriundos do processamento de frutas. Por exemplo, em resíduos de laranjas, Crizel et al. (2013) encontraram 63%, Fernandez-Lopez et al. (2009) 71,6% e Marín et al. (2007) 74,6% de FAT. Para farinha de casca de maracujá, Souza, Ferreira e Vieira (2008) encontraram 66% de FAT, e Córdova et al. (2005) 57,3%. Vieira et al. (2017) analisaram o teor em resíduos de acerola, que apresentaram 48,5% de FAT.

Entretanto, conteúdos bem menores de FAT foram encontrados por Abud e Narain (2009) em resíduos de maracujá, goiaba, acerola e umbu (47%, 43%, 14% e 13,5% respectivamente), e por Aguiar et al. (2010) em sementes de acerola (26,5%). As diferenças nos valores podem estar relacionadas com diferentes cultivares e variedades, assim como ao estágio de maturação da colheita e ao processamento sofrido.

Segundo Larrauri (1999), para que um produto seja considerado como ingrediente rico em fibras a ser utilizado pelas indústrias de alimentos, deve possuir acima de 50% de fibras, até 9% de umidade, e baixos teores de lipídeos e calorias. Além dos altos teores de fibras, já comentados acima, os resíduos apresentaram baixos teores de umidade (RA: 2,5%; RL: 6,2%) e de lipídeos (RA: 1,6%; RL: 2,6%), semelhantes aos determinados em outros estudos com resíduos (cascas e/ou sementes) de frutas (CRIZEL et al., 2013; FERNANDEZ-LOPEZ et al., 2009; CÓRDOVA et al., 2005).

Já os teores de proteínas encontrados no RA (10,45%) e no RL (9,9%) são considerados elevados, apenas um pouco abaixo dos teores de alimentos como farinha de aveia (13,9%) e farinha de centeio (12,5%), e acima dos teores proteicos de leguminosas, como ervilha em vagem (7,5%), lentilha cozida (6,3%) e feijão carioca cozido (4,8%) (TACO, 2011). Resíduos de frutas desidratados, portanto, são boas fontes de proteínas, assim como de carboidratos, conforme já relatado em outros estudos (VIEIRA et al., 2017; CRIZEL et al., 2013; AGUIAR et al., 2010; SOUZA, FERREIRA; VIEIRA, 2008).

A composição de minerais dos resíduos é apresentada na **Tabela 3**. Dentre os minerais analisados, magnésio, cálcio, fósforo e potássio foram os elementos em maiores quantidades. O RL apresentou teor de cálcio quase 3 vezes superior ao do RA, e teor de zinco 4 vezes superior. O teor de potássio foi similar nas duas amostras.

Segundo Lima et al. (2011), frutos geralmente são ricos em potássio, principalmente nas cascas, pois este é um elemento que apresenta grande mobilidade em plantas, devido à sua baixa afinidade para a formação de quelatos orgânicos. Os resíduos estudados podem ser considerados boas fontes deste mineral, pois 100 g do RA e do RL oferecem 15,3 e 16,5%, respectivamente, das recomendações diárias de potássio (INSTITUTE OF MEDICINE, 2005). O RL mostrou-se também excelente fonte de cobre e boa fonte de ferro.

Tabela 3. Composição de minerais dos resíduos desidratados de acerola (RA) e de laranja (RL).

MINERAIS	RA		RL	
	mg/100 g	% IDR	mg/100 g	% IDR
Potássio (K)	721	15	787	17
Cálcio (Ca)	248	25	708	71
Fósforo (P)	130	19	85	12
Magnésio (Mg)	101	39	78	30
Zinco (Zn)	0,4	6	1,7	24
Ferro (Fe)	nd	-	2,5	18
Cobre (Cu)	nd	-	2,4	267

Resultados expressos como média. % IDR: Porcentagem em relação a ingestão diária recomendada para adultos (ANVISA, 2005; Institute of Medicine, 2005). nd: não detectado.

4.1.2. Teores de compostos fenólicos totais, proantocianidinas totais e capacidade antioxidante *in vitro*

Os teores de compostos fenólicos totais (CF), proantocianidinas totais (PAC) e capacidade antioxidante *in vitro* dos resíduos são apresentados na **Tabela 4**.

Como podemos observar, não foram detectadas proantocianidinas no RL. Em contrapartida, o RA mostrou-se rico nestes compostos. O teor de CF diferiu significativamente ($p < 0,05$) entre as amostras de resíduos, e foi 3,6 vezes maior no RA (32,39 mg EAG/g b.s. contra 9,02 mg EAG/g b.s. no RL). Em relação à capacidade antioxidante, o RA foi onze vezes mais hábil em sequestrar o radical livre DPPH•, reduziu o poder do ferro sete vezes mais do que o RL, e absorveu o radical oxigênio duas vezes mais do que o RL.

Tabela 4. Teores de compostos fenólicos totais, proantocianidinas totais e capacidade antioxidante *in vitro* dos resíduos desidratados de acerola (RA) e de laranja (RL).

	RA	RL
Compostos fenólicos totais (mg EAG/g b.s.)	32,4 ± 1,2 ^a	9,0 ± 0,1 ^b
Proantocianidinas totais (mg EC/g b.s.)	617 ± 45	nd
FRAP (μmol ET/g b.s.)	149,7 ± 4,8 ^a	21,6 ± 1,1 ^b
DPPH (μmol ET/g b.s.)	105,4 ± 3,9 ^a	9,6 ± 0,2 ^b
ORAC (μmol ET/g b.s.)	527,7 ± 85,1 ^a	270,5 ± 12,3 ^b

Resultados expressos como média ± desvio padrão (DP). Letras diferentes na mesma linha mostram que existe diferença significativa ($p < 0,05$) entre as amostras. nd: não detectado.

Borges (2011) analisou o conteúdo de fenólicos de resíduos de frutas tropicais, encontrando valor semelhante (30,75 mg EAG/g b.s.) para o resíduo de acerola extraído com etanol/água (70:30). Porém, valores superiores foram encontrados por outros autores. Silva et al. (2014) caracterizaram subprodutos de diversas frutas tropicais, e encontraram 72,6 mg EAG/g b.s. para o resíduo de acerola. Já Rufino et al. (2010) encontraram 102,8 mg EAG/g b.s. A safra, o tipo de secagem, o processo de extração e o solvente utilizado talvez possam explicar estas diferenças.

O reagente de Folin-Ciocalteu não é específico para compostos fenólicos, podendo ser reduzido por outros compostos, como a vitamina C (HUANG; OU; PRIOR, 2005). Sendo assim, o resultado encontrado para o RA pode estar superestimado, já que o teor de vitamina C deste resíduo é elevado. De qualquer forma, a acerola se destaca entre outras frutas no que diz respeito às suas características fitoquímicas. Um estudo que comparou o conteúdo de polifenóis totais de resíduos de acerola, maracujá e abacaxi, encontrou 94,6 mg, 41,2 mg e 9,1 mg EAG/g, respectivamente (OLIVEIRA et al., 2009). O mesmo foi observado em outro estudo, onde os autores compararam resíduos de acerola, goiaba, abacaxi, cupuaçu, bacuri e graviola. O resíduo de acerola se destacou por suas propriedades antioxidantes (SOUSA et al., 2011).

O teor de CF obtido para o RL está bem próximo do previamente reportado por Lagha-Benamrouche e Madani (2013). Eles analisaram cascas e folhas de laranjas doces (*Citrus sinensis*) de diferentes regiões da Argélia, e em uma das regiões encontraram valor bem próximo ao do presente estudo (9,61 mg EAG/g). Outros autores caracterizaram cascas de diferentes frutas cítricas, e encontraram 10,5 mg/g de CF em cascas de laranjas (OBOH; ADEMOSUN, 2012). Karoui e Marzouk (2013) analisaram cascas de *Citrus aurantium*,

conhecido popularmente como laranja amarga, e encontraram teor um pouco abaixo (5,23 mg EAG/g b.s.), e Karimi et al (2012) encontraram 4,83 mg EAG/g para o mesmo fruto.

Proantocianidinas são compostos fenólicos que fazem parte da classe dos taninos condensados, e possuem unidades monoméricas de flavan-3-óis. Estes compostos têm diversos efeitos sobre os sistemas biológicos, uma vez que são quelantes de íons metálicos, ajudam a precipitar proteínas e agem como antioxidantes. São comumente encontrados em frutas, nozes, cereais, sementes (especialmente de uvas), vinho e chocolate (LI et al., 2015; ZHANG et al., 2015; IGNAT; VOLF; POPA, 2011). Os taninos são responsáveis pela adstringência dos alimentos fonte, pois como se ligam a proteínas salivares precipitando-as, resultam em falta de lubrificação na boca (SURIANO et al., 2015).

No método utilizado neste estudo para quantificação de PAC, os extratos dos resíduos são expostos a um meio ácido e alcoólico, sob aquecimento. Nestas condições, as ligações entre as unidades monoméricas rompem-se e as antocianidinas (pelargonidina, cianidina ou delphinidina) são liberadas (PORTER et al., 1986). Antocianidinas são agliconas, ou seja, não estão ligadas a moléculas de açúcar. Raramente são encontradas desta forma em frutas frescas (WU et al., 2006).

Não foram detectadas proantocianidinas no RL. Já no RA foram detectadas 617 µg EC/g b.s. (ou 0,617 mg EC/g b.s. ou 61,7 mg EC/100 g b.s.) de PAC. Este teor pode ser comparado com os de alguns frutos *in natura*, como maçã fuji (69,6 mg/100 g), pêssego (67,3 g/100 g) e uvas *red* (61,0 mg/100 g). Se compararmos com os teores de frutas consideradas as mais ricas em proantocianidinas, o RA possui 10 vezes menos do que *chokeberries*, 7 vezes menos do que *cramberries* e 5 vezes menos do que *blueberries* (GU et al., 2004). Segundo Wang et al. (2011), um adulto norte-americano consome em média 95 mg/dia de proantocianidinas. Sendo assim, pode-se considerar que o RA é uma boa fonte de proantocianidinas.

Os métodos mais utilizados para a determinação da capacidade antioxidante *in vitro* atualmente são FRAP, ABTS, DPPH e ORAC. É recomendado que se combine pelo menos dois destes ensaios para fornecer resultados confiáveis. Estudos previamente realizados reportaram que a acerola se destaca dentre outros frutos quanto à capacidade antioxidante. Por exemplo, Kuskoski et al. (2006) analisaram a atividade antioxidante de polpas de 10 frutas diferentes, através do sequestro do radical DPPH•. A polpa de acerola se destacou, mostrando potencial antioxidante bem superior ao das demais frutas. Oliveira et al. (2009) compararam a capacidade antioxidante de resíduos de 3 frutas diferentes: acerola, abacaxi e maracujá. O

resíduo de acerola apresentou capacidade de sequestro do radical DPPH• 20 a 25% maior do que a das outras frutas. Segundo os mesmos autores, a maior capacidade antioxidante do resíduo de acerola deve-se às antocianinas, muito mais do que à vitamina C. Em um outro estudo, também comparando resíduos da produção de polpas, a acerola apresentou maior quantidade de compostos antioxidantes (carotenoides, antocianinas e vitamina C) do que as outras frutas analisadas (goiaba, abacaxi, graviola, bacuri e cupuaçu) (SOUSA et al., 2011).

4.1.3. Perfil de flavonoides (CLAE-DAD)

Os perfis cromatográficos (270 nm) de flavonoides obtidos por CLAE para os resíduos desidratados de acerola e de laranja são apresentados nas figuras a seguir (**Figuras 3 a 5**). Nos extratos de RA eluídos com metanol, foram identificados picos de derivados de quercetina (que não rutina), procianidina B1, quercetina-3-ramnose, rutina e derivados de caempferol (**Figura 3**). Nas frações de RA eluídas com metanol:amônia não foram identificados compostos fenólicos. Nos extratos de RL eluídos com metanol, foram identificados os seguintes flavonoides: naringenina, sinensetina, homorientina e isovitexina, conforme mostra a **Figura 4**. E nas frações de RL eluídas com metanol:amônia foram encontrados picos de derivados de ácido clorogênico (**Figura 5**).

Figura 3. Perfil cromatográfico (270 nm) de flavonoides dos subprodutos desidratados de acerola.

Figura 4. Perfil cromatográfico (270 nm) de flavonoides dos subprodutos desidratados de laranja.

Figura 5. Perfil cromatográfico (270 nm) de ácidos fenólicos dos subprodutos desidratados de acerola.

Mezadri et al. (2008) encontraram picos de procianidina B1 e rutina em sucos e polpas comerciais de acerola. Bataglion et al. (2015) e Correia et al. (2012) encontraram quercetina e caempferol em resíduo de acerola. Quercetina é um dos flavonoides mais estudados. Está presente em diversos alimentos de origem vegetal, e em alguns países, está disponível como um suplemento dietético (doses diárias entre 200 e 1200 mg), e como um nutracêutico para alimentos funcionais (na dose de 0,008 - 0,5% ou 10 - 125 mg por porção) (D'ANDREA, 2015). É considerado um dos mais potentes flavonoides no sequestro de espécies reativas de oxigênio (EROs), e como inibidor da peroxidação lipídica, podendo melhorar quadros de doenças como as cardiovasculares, diabetes, e as neurodegenerativas, como Alzheimer e Parkinson (LU et al., 2015; ANSARI et al., 2009; MCANULTY et al., 2008; SAKANASHI et al., 2008). Um estudo demonstrou o efeito protetor da quercetina contra a inflamação do fígado de ratos (MA et al., 2015), e um outro estudo, conduzido por Gardi et al. (2015), que trataram ratos com artrite induzida, com uma dose oral diária de quercetina de 150 mg/kg de

peso corporal, demonstrou que ela foi capaz de melhorar todos os marcadores de inflamação e estresse oxidativo.

Os flavonoides predominantes em laranjas são as flavanonas naringenina e hesperetina (FERNANDEZ-LOPEZ et al. 2009; SAWALHA et al., 2009; WANG; CHUANG; HSU, 2008), mas alguns pesquisadores também encontraram o flavonoide sinensetina em frutas cítricas (ZHANG et al., 2014; BERMEJO; LLOSA; CANO, 2011; WANG; CHUANG; HSU, 2008). Naringenina tem sido relatada como agente coadjuvante no controle do diabetes tipo 2 e suas complicações. Priscilla et al. (2014) sugeriram que este composto, na dose de 25 mg/kg de peso, exerce atividade inibitória da enzima α -glicosidase no intestino de ratos, diminuindo assim os níveis de glicose pós-prandial destes animais. Os mesmos autores sugerem, em outro estudo, que a naringenina pode ser usada como ingrediente nutracêutico e funcional no combate ao diabetes tipo 2, por melhorar os quadros de hiperglicemia e hiperlipidemia (testes *in vivo* com ratos diabéticos) (PRISCILLA; JAYAKUMAR; THIRUMURUGAN, 2015). Em um outro estudo, também com ratos, os pesquisadores sugerem que a administração de 50 mg/Kg de peso tem efeito protetor significativo contra o estresse oxidativo, restaurando células do tecido cardíaco (CHTOUROU et al., 2015a). Ainda segundo estes autores, a naringenina também atuaria como hepatoprotetora (CHTOUROU et al., 2015b).

Os subprodutos desidratados de acerola e de laranja analisados apresentaram elevados teores de fibras alimentares totais e proteínas, além de reduzidos teores de umidade e gorduras. O resíduo desidratado de acerola (RA) demonstrou ser fonte superior de compostos fenólicos, além de apresentar expressiva atividade antioxidante *in vitro*. Também se destacou por sua elevada concentração de vitamina C. Sendo assim, quatro diferentes formulações de leites fermentados probióticos foram produzidas, sendo uma delas utilizada como controle, sem adição de RA, e as outras três adicionadas de RA em diferentes concentrações (2%, 5% e 10%), para dar continuidade ao presente estudo.

4.2. Parâmetros físico-químicos obtidos para os leites fermentados durante o armazenamento sob refrigeração (4 ± 1 °C; 28 dias)

4.2.1. Composição centesimal e VET

A composição centesimal obtida para as quatro formulações de leites fermentados, assim como o valor energético total (VET), é apresentada na **Tabela 5**.

Tabela 5. Composição centesimal e VET dos leites fermentados probióticos.

	F0	F2	F5	F10
Umidade (g)	87,2 ± 0,2 ^d	85,7 ± 0,2 ^c	82,9 ± 0,2 ^b	78,2 ± 0,2 ^a
Cinzas (g)	1,1 ± 0,1 ^d	1,1 ± 0,1 ^c	1,2 ± 0,1 ^b	1,3 ± 0,1 ^a
Proteínas totais (g)	4,1 ± 0,1 ^b	3,9 ± 0,2 ^b	4,7 ± 0,3 ^a	5,1 ± 0,5 ^a
Lipídeos totais (g)	0,1 ± 0,0 ^c	0,4 ± 0,0 ^b	0,4 ± 0,0 ^b	0,7 ± 0,0 ^a
Carboidratos totais (g)	7,5	8,9	10,8	14,7
VET (Kcal)	47	52	60	73

Resultados de umidade, cinzas, proteínas e lipídeos expressos como média ± desvio padrão (DP). Letras diferentes na mesma linha mostram que existe diferença significativa ($p < 0,05$) entre as diferentes formulações de leites fermentados. VET: valor energético total. F0: formulação sem adição de resíduo de acerola (RA); F2: 2% de RA; F5: 5% de RA; F10: 10% de RA.

Devido à adição de subprodutos de acerola nas formulações F2, F5 e F10, em diferentes concentrações, os teores médios de umidade e de cinzas diferiram significativamente ($p < 0,05$) em todos os tratamentos. Conforme aumenta a quantidade de pó de RA adicionada, diminui o teor de umidade e aumenta ligeiramente o teor de cinzas dos leites fermentados.

O teor médio de proteínas das formulações F5 e F10 (4,7 % e 5,1 %, respectivamente) apresentaram-se maiores significativamente ($p < 0,05$) do que os teores em F0 e F2. Este fato indica que a maior quantidade de pó de subprodutos de acerola adicionada em F5 e F10 influenciou no teor de proteínas dos produtos finais, visto que o resíduo contém 10,4% de proteína em sua composição (vide **Tabela 2**).

Os teores de proteínas das quatro formulações estão de acordo com a legislação vigente, que exige teor mínimo de proteínas de 2,9 g/100 g para leites fermentados (MAPA, 2007). Jridi et al. (2015) analisaram o teor de proteínas de sobremesas lácteas elaboradas com subprodutos de tâmaras, e os valores médios ficaram entre 3,9 g e 6,5 g/100 g, bem próximos aos encontrados neste estudo.

O teor de lipídeos de todas as formulações ficou abaixo de 1%. Este resultado já era esperado, pois os leites fermentados foram elaborados com leite de vaca desnatado, cujo teor de lipídeos totais é menor do que 0,5%, e o RA, adicionado em F2, F5 e F10, contém apenas 1,6% de lipídeos totais em sua composição, conforme apresentado (**Tabela 2**).

4.2.2. pH e acidez

Os valores médios de acidez e pH das formulações de leites fermentados são apresentados na **Tabela 6**.

Tabela 6. Valores de pH e acidez obtidos para os leites fermentados durante o armazenamento sob refrigeração (28 dias; 4 ± 1 °C).

Leites fermentados	Tempo (dias)	pH	Acidez (mg de ác. láctico/g)
F0	1	$4,66 \pm 0,05$ ^{Ba}	$0,92 \pm 0,03$ ^{Ab}
	7	$4,58 \pm 0,04$ ^{Aa}	-
	14	$4,57 \pm 0,01$ ^{Ba}	$1,13 \pm 0,08$ ^{Aa}
	21	$4,54 \pm 0,06$ ^{Ba}	-
	28	$4,51 \pm 0,10$ ^{Aa}	$1,15 \pm 0,10$ ^{Ba}
F2	1	$4,70 \pm 0,02$ ^{Ba}	$0,99 \pm 0,05$ ^{Ab}
	7	$4,60 \pm 0,03$ ^{Aa}	-
	14	$4,60 \pm 0,01$ ^{Ba}	$1,14 \pm 0,07$ ^{Aa}
	21	$4,57 \pm 0,05$ ^{Ba}	-
	28	$4,55 \pm 0,10$ ^{Aa}	$1,15 \pm 0,12$ ^{Ba}
F5	1	$4,77 \pm 0,24$ ^{Ba}	$1,01 \pm 0,09$ ^{Ab}
	7	$4,63 \pm 0,09$ ^{Aab}	-
	14	$4,64 \pm 0,22$ ^{Bab}	$1,20 \pm 0,14$ ^{Aa}
	21	$4,60 \pm 0,22$ ^{ABab}	-
	28	$4,56 \pm 0,24$ ^{Ab}	$1,28 \pm 0,26$ ^{Aa}
F10	1	$5,02 \pm 0,29$ ^{Aa}	$0,99 \pm 0,07$ ^{Ab}
	7	$4,74 \pm 0,11$ ^{Ab}	-
	14	$4,86 \pm 0,23$ ^{Aab}	$1,15 \pm 0,04$ ^{Aa}
	21	$4,78 \pm 0,26$ ^{Ab}	-
	28	$4,69 \pm 0,26$ ^{Ab}	$1,27 \pm 0,11$ ^{ABa}

Resultados expressos como média de dois lotes $\pm$ desvio padrão (DP). Letras maiúsculas sobrescritas distintas na mesma coluna indicam diferenças significativas ($p < 0,05$) entre as diferentes formulações de leites fermentados para um mesmo dia de armazenamento. Letras minúsculas sobrescritas distintas na mesma coluna indicam diferenças significativas ($p < 0,05$) entre os diferentes dias de armazenamento para uma mesma formulação. F0: formulação sem adição de resíduo de acerola (RA); F2: 2% de RA; F5: 5% de RA; F10: 10% de RA.

De modo geral, o pH de todas as formulações sofreu quedas durante o período de estocagem sob refrigeração (28 dias; 4 ± 1 °C). No entanto, a queda de pH nas formulações F0 e F2 não foi significativa ($p < 0,05$). A acidez de todas as formulações aumentou em relação ao primeiro dia de armazenamento, mantendo-se igual significativamente, para a mesma formulação, nos dias 14 e 28. Os valores de acidez, que variaram de 0,92 a 1,28 mg de

ácido láctico/g, estão de acordo com a norma vigente, que exige valores de acidez entre 0,6 e 2,0 para leites fermentados (MAPA, 2007).

Esta queda de pH em produtos lácteos fermentados, ao longo da vida de prateleira, é esperada, assim como o aumento da acidez, devido à produção de ácido láctico e outros ácidos orgânicos pelas bactérias, durante a fermentação e o estoque refrigerado (28 dias; 4 ± 1 °C), como resultado do seu crescimento e metabolismo. Algumas cepas de bactérias são capazes de alterar o perfil de ácidos graxos do leite e produzirem ácidos graxos funcionais. Na presença de frutas, grãos, cereais e hortaliças, a produção de ácidos pelas bactérias pode aumentar ainda mais, devido à presença de compostos fenólicos e fibras alimentares, solúveis e insolúveis (SAH et al., 2016; CASAROTTI; PENNA, 2015; BEDANI et al., 2014; AGIL; HOSSEINIAN, 2012; ESPÍRITO-SANTO et al., 2012; PEREIRA et al., 2010). Talvez isso explique o fato de os valores para acidez das formulações com maiores quantidades de pó de subprodutos, F5 e F10, serem maiores significativamente ($p < 0,05$) do que em F0 e F2, ao final da vida de prateleira (28° dia).

Sah et al. (2016) observaram quedas significativas de pH em todas as amostras de iogurtes probióticos analisadas durante o período de 28 dias sob refrigeração (4 ± 1 °C), sendo que nas formulações adicionadas de pó de cascas de abacaxi, a queda de pH foi maior quando comparadas às formulações controle. Bedani et al. (2014) obtiveram valores de pH próximos aos apresentados neste trabalho, para iogurtes de soja simbióticos adicionados de farinha de okara, subproduto da produção de leite de soja. Outros autores também observaram quedas nos valores de pH e aumento da acidez em produtos lácteos fermentados, ao longo do período de armazenamento (CASAROTTI; PENNA, 2015; PEREIRA et al., 2010; CARDARELLI et al., 2008).

A formulação F10, que possui a maior quantidade de RA adicionada, apresentou pH significativamente maior ($p < 0,05$) que das outras formulações, no 1° e no 14° dia de armazenamento. Algumas cepas, na presença de produtos frutados, podem reduzir sua produção de ácido orgânico em alguns momentos, fazendo com que o pH e a acidez do produto se mantenham (ESPÍRITO-SANTO et al., 2012). Entretanto, ao final de 28 dias, todas as formulações apresentaram pHs significativamente iguais.

4.2.3. Viabilidade dos microrganismos

A viabilidade das cepas probióticas *Bifidobacterium animalis* subsp *lactis* Bb-12 e *Lactobacillus acidophilus* La-5, e da cultura starter *Streptococcus thermophilus*, das quatro

formulações, foi avaliada uma vez por semana, durante todo o período de armazenamento sob refrigeração (28 dias; 4 ± 1 °C), em dois lotes, e os resultados são apresentados na **Tabela 7**.

A contagem de microrganismos do presente estudo, para todas as cepas analisadas, apresentou valores entre 7,86 e 8,99 log UFC/g. Estes dados estão em conformidade com a legislação vigente, que exige que os microrganismos dos cultivos utilizados em leites fermentados devem ser viáveis e ativos, e estarem em concentração igual ou superior a 10^6 UFC/g no produto final e durante seu prazo de validade (MAPA, 2007).

Tabela 7. Populações de *Bifidobacterium animalis* subsp *lactis* Bb-12, *Lactobacillus acidophilus* La-5 e *Streptococcus thermophilus* (cultura *starter*) obtidas para os leites fermentados F0, F2, F5 e F10 durante o armazenamento sob refrigeração (28 dias; 4 ± 1 °C).

		Populações (log UFC/g)			
		Leites fermentados			
Microrganismos	Tempo (dias)	F0	F2	F5	F10
<i>Bifidobacterium animalis</i> subsp <i>lactis</i> Bb-12	1	$8,99 \pm 0,07$ ^{Aa}	$8,96 \pm 0,08$ ^{Aa}	$8,96 \pm 0,05$ ^{ABab}	$8,94 \pm 0,07$ ^{Aa}
	7	$8,96 \pm 0,06$ ^{Aa}	$8,86 \pm 0,07$ ^{ABab}	$8,97 \pm 0,17$ ^{Aa}	$8,77 \pm 0,10$ ^{Bb}
	14	$8,92 \pm 0,15$ ^{Aa}	$8,87 \pm 0,08$ ^{ABb}	$8,86 \pm 0,08$ ^{ABbc}	$8,78 \pm 0,11$ ^{Bb}
	21	$8,87 \pm 0,10$ ^{Aa}	$8,66 \pm 0,27$ ^{Bd}	$8,58 \pm 0,18$ ^{Bd}	$8,44 \pm 0,18$ ^{Cd}
	28	$8,90 \pm 0,18$ ^{Aa}	$8,73 \pm 0,08$ ^{BCc}	$8,83 \pm 0,22$ ^{ABc}	$8,65 \pm 0,11$ ^{Cc}
<i>Lactobacillus acidophilus</i> La-5	1	$8,45 \pm 0,15$ ^{BCa}	$8,33 \pm 0,17$ ^{Ca}	$8,66 \pm 0,07$ ^{Aa}	$8,59 \pm 0,09$ ^{ABa}
	7	$8,39 \pm 0,06$ ^{Ba}	$8,40 \pm 0,03$ ^{Ba}	$8,72 \pm 0,16$ ^{Aa}	$8,50 \pm 0,08$ ^{Bab}
	14	$8,34 \pm 0,15$ ^{Ba}	$8,19 \pm 0,21$ ^{Ba}	$8,61 \pm 0,13$ ^{Aa}	$8,38 \pm 0,18$ ^{Bb}
	21	$8,02 \pm 0,24$ ^{Bb}	$7,93 \pm 0,25$ ^{Bb}	$8,37 \pm 0,10$ ^{Ab}	$8,18 \pm 0,21$ ^{Bd}
	28	$8,07 \pm 0,17$ ^{Bb}	$7,86 \pm 0,40$ ^{Cb}	$8,37 \pm 0,13$ ^{Ab}	$8,28 \pm 0,07$ ^{Ac}
<i>Streptococcus thermophilus</i>	1	$8,98 \pm 0,11$ ^{Aa}	$8,87 \pm 0,04$ ^{Ba}	$8,88 \pm 0,06$ ^{ABa}	$8,53 \pm 0,15$ ^{Ca}
	7	$8,91 \pm 0,05$ ^{Aab}	$8,65 \pm 0,07$ ^{Bb}	$8,71 \pm 0,14$ ^{Bb}	$8,47 \pm 0,18$ ^{Ca}
	14	$8,88 \pm 0,11$ ^{Aab}	$8,62 \pm 0,10$ ^{Bb}	$8,62 \pm 0,09$ ^{Bbc}	$8,23 \pm 0,27$ ^{Cb}
	21	$8,73 \pm 0,22$ ^{Ab}	$8,54 \pm 0,15$ ^{Bb}	$8,52 \pm 0,25$ ^{Bc}	$8,22 \pm 0,13$ ^{Cb}
	28	$8,66 \pm 0,10$ ^{Abc}	$8,32 \pm 0,18$ ^{Cc}	$8,49 \pm 0,15$ ^{Bc}	$8,08 \pm 0,36$ ^{Dc}

Resultados expressos como média de dois lotes $\pm$ DP. Letras maiúsculas sobrescritas distintas na mesma linha indicam diferenças significativas ($p < 0,05$) entre as diferentes formulações de leites fermentados para um mesmo dia de armazenamento. Letras minúsculas sobrescritas distintas na mesma coluna indicam diferenças significativas ($p < 0,05$) entre os diferentes dias de armazenamento para uma mesma formulação e mesma cepa. F0: formulação sem adição de resíduo de acerola (RA); F2: 2% de RA; F5: 5% de RA; F10: 10% de RA.

As populações de *B. animalis* mantiveram-se estáveis ($p > 0,05$) na formulação controle (F0) durante todo o período de estocagem (28 dias), porém nas formulações adicionadas de RA (F2, F5 e F10), sofreram quedas significativas ($p < 0,05$) entre os dias 7 e 14 de armazenamento sob refrigeração (4 ± 1 °C). No 21º dia, a formulação controle apresentou contagens de *B. animalis* significativamente maiores em relação às outras. Porém, entre os dias 21 e 28 de armazenamento, houve aumento significativo ($p < 0,05$) nas populações de bifidobactérias nas formulações adicionadas de RA.

Sendo assim, ao final da vida de prateleira dos produtos, as contagens de *B. animalis* para F5 se igualaram à formulação controle, e, apesar de as populações em F10 apresentarem-se significativamente menores ($p < 0,05$), do ponto de vista microbiológico não são consideradas diferentes, uma vez que estão no mesmo ciclo logarítmico, com diferença de apenas 0,25 log UFC/g em relação ao controle.

As formulações F5 e F10, que contêm maiores quantidades de RA adicionadas, apresentaram contagens de *L. acidophilus* significativamente maiores ($p < 0,05$) do que em F0 e F2, ao final de 28 dias de armazenamento. Porém, tais populações, assim como em *B. animalis*, sofreram quedas ao longo da vida de prateleira, em todas as formulações de leites fermentados, especialmente a partir do 21º dia de estocagem. Ainda com relação às populações de *L. acidophilus*, podemos observar que a formulação contendo 5% de RA foi a mais favorável, tendo em vista que, de modo geral, manteve suas contagens sempre superiores às das outras formulações durante toda a vida de prateleira.

Sendra et al. (2008) avaliou a sobrevivência de três bactérias probióticas: *L. acidophilus*, *B. bifidum* e *L. casei*, em leites fermentados contendo 1% de subprodutos do processamento de frutas cítricas para obtenção de sucos, durante o armazenamento sob refrigeração (30 dias). As fibras cítricas aumentaram as populações de lactobacilos estudadas, mas o mesmo não aconteceu com as populações de bifidobactérias. Espírito-Santo et al. (2012) não observaram efeitos inibitórios sobre as populações de *L. acidophilus*, assim como no presente estudo, ao avaliar as contagens da bactéria em leites fermentados adicionados de pó de casca de maracujá, quando comparado com o controle.

As populações da cultura starter *S. thermophilus* sofreram quedas durante o período de armazenamento sob refrigeração (28 dias; 4 ± 1 °C), e esta queda foi maior nas formulações adicionadas de RA. Resultados semelhantes foram encontrados por Espírito-Santo et al. (2010), que observaram menores contagens de populações de *S. thermophilus* em iogurtes adicionados de polpa de açaí, em relação aos iogurtes sem adição de açaí. A formulação

controle (F0) do presente estudo apresentou contagens de *S. thermophilus* significativamente superiores ($p < 0,05$) às demais, durante todo o período de armazenamento (28 dias).

Casarotti e Penna (2015) observaram quedas nas populações de *B. animalis* subsp. *lactis* Bb-12 e *L. acidophilus* La-5, em leites fermentados adicionados de 1% de farinha industrializada de maçã, banana ou uva. Já as populações de *S. thermophilus* mantiveram-se estáveis. Em resumo, as populações de microorganismos probióticos podem variar, dependendo da composição da matriz alimentar (CASAROTTI; PENNA, 2015; ESPÍRITO-SANTO et al., 2012; SENDRA et al., 2008). De acordo com estudo de revisão realizado por Donkor et al. (2006), dentre os fatores que mais afetam a viabilidade de bifidobactérias e lactobacilos, estão: temperatura de incubação, pH, ácidos lático e acético, promotores e inibidores de crescimento, presença de peróxido de hidrogênio e oxigênio, concentração de metabólitos, temperatura de armazenamento e disponibilidade de nutrientes.

De modo geral, os resultados de viabilidade obtidos no presente estudo mostram que o RA não interferiu de maneira negativa nas populações de microrganismos analisadas, já que as formulações F2, F5 e F10 mantiveram suas populações em torno de 8 log UFC/g. Vieira et al. (2017) concluíram, em recente estudo, que subprodutos de acerola são capazes de aumentar populações de cepas benéficas e inibir bactérias indesejáveis (*Escherichia coli* e *Clostridium perfringens*). Sendo assim, o pó de RA pode ser promissor como nova fonte de ingrediente prebiótico. Agil e Hosseinian (2012) avaliaram o efeito da adição de 4% de farelo de tritcale em iogurtes com *L. acidophilus* e *B. lactis*. Os autores sugerem que o farelo pode ter servido como substrato para o crescimento e desenvolvimento das bactérias estudadas. Porém, para confirmar tal hipótese, ressaltam que é necessário determinar a composição do candidato a ingrediente prebiótico, como o grau de pureza, composição de monossacarídeos, grau de polimerização e distribuição do peso molecular.

4.2.4. Compostos fenólicos totais

Os teores de compostos fenólicos totais (CF) das formulações de leites fermentados encontram-se na **Tabela 8**. As amostras diferiram significativamente entre si ($p < 0,05$). A formulação controle (F0), sem adição de pó de RA, apresentou teor de CF em torno de 5 vezes inferior ao teor em F10 (21,13 e 101,13 µg EAG/100 g, respectivamente, dia 1). Este fato se deve aos compostos fenólicos presentes no RA, mas também à vitamina C. Favaro-Trindade et al. (2006) não observaram alteração no teor de vitamina C de sorvetes de acerola fermentados, mostrando que o processo de pasteurização, pH, condições de armazenamento e

os microrganismos presentes não influenciaram de maneira negativa na concentração da vitamina.

O processo de fermentação, realizado pelas bactérias durante a produção dos leites fermentados, pode ter contribuído com o aumento do conteúdo fenólico total de F2, F5 e F10. Isso seria possível porque alguns microrganismos sintetizam enzimas capazes de quebrar as ligações de éster e, conseqüentemente, liberar fenólicos ligados (EL-SAID et al., 2014; KNOCKAERT et al., 2012; OLIVEIRA et al., 2012; AJILA et al., 2011; JAMAL; IDRIS; ALAM, 2011).

Tabela 8. Teores de compostos fenólicos totais dos leites fermentados F0, F2, F5 e F10 no produto final (1 dia) e após 14 e 28 dias de armazenamento sob refrigeração (4 ± 1 °C).

	Tempo (dias)	F0	F2	F5	F10
Compostos	1	21,13 $\pm$ 3,87 ^d	37,53 $\pm$ 10,64 ^c	65,67 $\pm$ 21,28 ^b	101,13 $\pm$ 22,02 ^a
fenólicos totais	14	18,03 $\pm$ 1,43 ^d	33,40 $\pm$ 3,76 ^c	58,90 $\pm$ 8,45 ^b	95,71 $\pm$ 9,95 ^a
(μ g EAG/100 g b.u.)	28	18,35 $\pm$ 0,31 ^d	33,08 $\pm$ 3,88 ^c	60,43 $\pm$ 12,43 ^b	96,35 $\pm$ 12,99 ^a

Resultados expressos como média de dois lotes $\pm$ DP. Letras minúsculas sobrescritas distintas na mesma linha indicam diferenças significativas ($p < 0,05$) entre as diferentes formulações de leites fermentados para um mesmo dia de armazenamento. F0: formulação sem adição de resíduo de acerola (RA); F2: 2% de RA; F5: 5% de RA; F10: 10% de RA.

O teor de compostos fenólicos de todas as formulações analisadas sofreu pequena queda entre os dias 1 e 14, porém esta queda não foi significativa ($p > 0,05$), e os valores se mantiveram até o 28º dia. Karaaslan et al. (2011) obtiveram resultados opostos, pois todas as amostras de iogurtes analisadas, adicionadas de extrato de diferentes cultivares de uvas, tiveram seu conteúdo fenólico total diminuído significativamente ($p < 0,05$) ao longo do período de estocagem. Polifenóis têm afinidade por proteínas, e a interação entre as cadeias laterais de aminoácidos e os anéis aromáticos dos polifenóis levam à formação de complexos solúveis, que podem crescer em tamanho e até formar sedimentos. Oliveira et al. (2015) avaliaram, qualitativamente e quantitativamente, proteínas e compostos fenólicos em iogurtes adicionados de 20% de preparado de morangos, durante 28 dias sob refrigeração. Os autores concluíram que o teor de compostos fenólicos totais e o teor de proteínas do soro do leite diminuiriam ao longo da vida de prateleira. Uma solução sugerida pelos pesquisadores para diminuir essa interação seria a adição de hidrocolóides neutros aos iogurtes.

O resíduo de acerola, adicionado em F2, F5 e F10, por ser rico em fibras, pode ter minimizado a interação entre polifenóis e proteínas, fazendo com que o teor de compostos

fenólicos totais tenha se mantido durante toda a vida de prateleira dos produtos. O mesmo pode ter acontecido com iogurtes adicionados de 3% e 6% de cascas de avelã, sendo estas fontes de fibras (teor acima de 50%), pois os CF das amostras mantiveram-se estáveis durante os 21 dias de estocagem (BERTOLINO et al., 2015).

Os compostos fenólicos presentes nas formulações F2, F5 e F10, podem ter efeitos positivos na microbiota humana após a ingestão, desempenhando um papel regulador, através da interação com bactérias probióticas, melhorando a saúde gastrointestinal. Pesquisas estão sendo realizadas neste sentido, a fim de comprovar o possível estímulo que os compostos fenólicos podem exercer sobre o crescimento de bactérias benéficas no intestino. Hervert-Hernández et al. (2009) investigaram o efeito de polifenóis de uvas sobre o crescimento de *L. acidophilus*. Para isso, adicionaram extrato de bagaço de uva ao meio de cultura, e incubaram a 37 °C, durante 48 h, em anaerobiose. O extrato de bagaço de uva induziu a um aumento significativo da biomassa de *L. acidophilus* CECT 903. Em outro estudo, extrato rico em polifenóis de cascas de romã aliviou a hipercolesterolemia em ratos obesos induzidos por dieta rica em gordura, e os autores atribuíram este resultado à possível modulação da microbiota intestinal (NEYRINCK et al., 2013).

Além dos possíveis efeitos positivos sobre a microbiota intestinal, os compostos fenólicos presentes no RA podem ser vistos como conservantes naturais nas formulações, devido às suas propriedades antioxidantes, capazes de diminuir a oxidação lipídica (OLIVEIRA et al., 2012; BHANGER et al., 2008).

4.2.5. Cor e textura instrumentais

A **Tabela 9** apresenta os resultados referentes aos parâmetros luminosidade (L^*) e coordenadas de cromaticidade (a^* e b^*), utilizados para a determinação da cor dos leites fermentados elaborados com diferentes concentrações de pó de subprodutos de acerola (2%, 5% e 10%), e também da formulação controle (F0, sem RA), durante o período de armazenamento sob refrigeração (28 dias; 4 ± 1 °C). A cor de um produto influencia muito em sua aceitação e preferência, especialmente quando se trata de leites fermentados e iogurtes, que possuem longa vida de prateleira. Possíveis alterações de cor podem levar a efeitos negativos nas propriedades organolépticas.

Tabela 9. Parâmetros de cor – luminosidade (L*) e coordenadas de cromaticidade (a* e b*) – dos leites fermentados F0, F2, F5 e F10 no produto final (1 dia) e após 14 e 28 dias de armazenamento sob refrigeração (4 ± 1 °C).

Leites fermentados	Tempo (dias)	L*	a*	b*
F0	1	$86,15 \pm 0,64^a$	$0,37 \pm 0,22^d$	$9,41 \pm 0,16^c$
	14	$85,69 \pm 0,82^a$	$0,18 \pm 0,13^d$	$9,94 \pm 0,18^c$
	28	$84,51 \pm 0,27^a$	$0,35 \pm 0,14^d$	$10,78 \pm 0,19^c$
F2	1	$67,38 \pm 3,33^b$	$5,51 \pm 0,63^c$	$17,41 \pm 1,79^b$
	14	$67,36 \pm 3,08^b$	$5,48 \pm 0,67^c$	$17,58 \pm 2,04^b$
	28	$66,94 \pm 3,11^b$	$5,58 \pm 0,75^c$	$17,65 \pm 2,06^b$
F5	1	$57,13 \pm 4,12^c$	$8,29 \pm 0,82^b$	$21,75 \pm 1,13^a$
	14	$56,91 \pm 4,31^c$	$8,23 \pm 1,07^b$	$21,37 \pm 1,36^a$
	28	$56,53 \pm 4,36^c$	$8,14 \pm 1,08^b$	$21,07 \pm 1,44^a$
F10	1	$45,71 \pm 2,76^d$	$10,91 \pm 0,43^a$	$21,31 \pm 0,71^a$
	14	$45,84 \pm 2,42^d$	$10,92 \pm 0,56^a$	$21,50 \pm 0,33^a$
	28	$45,68 \pm 2,55^d$	$10,76 \pm 0,64^a$	$21,35 \pm 0,38^a$

Valores expressos como média de dois lotes $\pm$ DP. Letras minúsculas sobrescritas distintas na mesma coluna indicam diferenças significativas ($p < 0,05$) entre as diferentes formulações de leites fermentados para o mesmo parâmetro analisado. F0: formulação sem adição de resíduo de acerola (RA); F2: 2% de RA; F5: 5% de RA; F10: 10% de RA.

Podemos observar que todas as amostras se mostraram diferentes significativamente ($p < 0,05$) em relação ao parâmetro L*. O parâmetro L* pode determinar valores entre zero (0) e cem (100), sendo que quanto mais próximo de cem, mais a amostra tende para o branco, refletindo mais luz, e do contrário, maior tendência para a cor preta (MINOLTA, 2007). Na **Figura 6** podemos observar a olho nu que existem diferenças entre as cores dos produtos, e a análise realizada nos confirma estas diferenças. O leite fermentado F0 (sem adição de RA) apresentou valores de L* mais próximos a cem, refletindo, portanto, mais luz quando comparado às outras formulações.

A cor da casca de acerolas pode variar de vermelho-amarelada, vermelho-alaranjada ou vermelha a vermelho-púrpura. A cor da polpa pode ser amarela, alaranjada ou vermelha (RITZINGER; RITZINGER, 2011; MEZADRI et al., 2008). Os subprodutos de acerola, utilizados neste trabalho, eram compostos por cascas, sementes e polpa de acerolas. Eles passaram por longo período de aquecimento, para secagem. A degradação de açúcares durante o aquecimento, ou através de reações de Maillard, formam compostos de cor castanha. Estes compostos, juntamente com diversos outros pigmentos e compostos aromáticos, adicionam

sabor e coloração aos produtos (AGUEDO et al., 2012). Portanto, a escuridão observada nas amostras F2, F5 e F10 deve-se à coloração do resíduo e à quantidade adicionada em cada uma.

Figura 6. Amostras de leites fermentados probióticos (da esquerda para a direita): F0 (formulação controle, sem adição de resíduo de acerola (RA)), F2 (2% de RA), F5 (5% de RA) e F10 (10% de RA). Fonte: arquivo pessoal.

As coordenadas de cromaticidade a^* e b^* indicam as direções das cores: $+a^*$ é a direção do vermelho, $-a^*$ é a direção do verde; $+b^*$ é a direção do amarelo e $-b^*$ é a direção do azul (MINOLTA, 2007). Para todas as formulações, os valores de a^* foram positivos, ou seja, tendendo para o avermelhado. O mesmo acontece para os valores de b^* , pois todas as formulações foram positivas em direção ao amarelo. Esta tendência também foi encontrada em outros estudos com produtos lácteos fermentados (COSTA et al., 2015; KARAASLAN et al., 2011; GARCÍA-PEREZ et al., 2005). O processo de pasteurização da mistura favorece a liberação de alguns pigmentos, tornando o produto mais amarelo. Além disso, induz a uma desestabilização das micelas de caseína, fazendo com que aumentem os valores de a^* e b^* (GARCÍA-PEREZ et al., 2005).

A amostra F10 é aproximadamente dez vezes mais “avermelhada” e duas vezes mais “amarelada” do que a amostra F0, que não contém RA. A adição de frutas a produtos lácteos faz com que eles apresentem maiores valores de a^* e b^* , por conta dos pigmentos naturais presentes, como carotenoides e antocianinas. A estabilidade desses pigmentos pode ser afetada pelo pH, temperatura de armazenamento, enzimas, atividade microbiana, ácidos e íons metálicos. Sendo assim, esses pigmentos podem “vazar” no produto, fazendo com que a cor seja alterada ao longo do período de estocagem (COSTA et al., 2015; ESTRADA et al., 2011; KARAASLAN et al., 2011). Todos os parâmetros de cor analisados mantiveram-se estáveis ($p > 0,05$) durante a vida de prateleira, em todas as formulações. Os pigmentos dos subprodutos de acerola podem ter ficado “presos” à estrutura de gel dos leites fermentados, por conta das fibras presentes, que possuem alta capacidade em reter água. Assim, menos soro

foi expulso do gel, diminuindo a sinérese, mantendo a cor dos produtos (GARCÍA-PÉREZ et al., 2005).

Na **Tabela 10**, podemos observar os dados de textura obtidos para os leites fermentados no primeiro dia após a fabricação (dia 1), e após 14 e 28 dias de armazenamento sob refrigeração (4 ± 1 °C). Os parâmetros analisados foram: firmeza, adesividade, coesividade, elasticidade e gomosidade.

Tabela 10. Parâmetros de textura instrumental (dureza, adesividade, coesividade, elasticidade e gomosidade) dos leites fermentados F0, F2, F5 e F10 no produto final (1 dia) e após 14 e 28 dias de armazenamento sob refrigeração (4 ± 1 °C).

Parâmetros de textura	Tempo (dias)	F0	F2	F5	F10
Firmeza (N)	1	0,012 $\pm$ 0,008 ^{Aa}	0,016 $\pm$ 0,013 ^{Aa}	0,022 $\pm$ 0,004 ^{Aa}	0,025 $\pm$ 0,006 ^{Aa}
	14	0,018 $\pm$ 0,010 ^{Aa}	0,024 $\pm$ 0,013 ^{Aa}	0,018 $\pm$ 0,009 ^{Aa}	0,021 $\pm$ 0,023 ^{Aa}
	28	0,022 $\pm$ 0,014 ^{Aa}	0,020 $\pm$ 0,010 ^{Aa}	0,017 $\pm$ 0,013 ^{Aa}	0,022 $\pm$ 0,015 ^{Aa}
Adesividade (N s)	1	0,111 $\pm$ 0,054 ^{Aa}	0,121 $\pm$ 0,047 ^{Aa}	0,141 $\pm$ 0,040 ^{Aa}	0,140 $\pm$ 0,072 ^{Aa}
	14	0,068 $\pm$ 0,036 ^{Bb}	0,113 $\pm$ 0,029 ^{Aa}	0,112 $\pm$ 0,031 ^{Aa}	0,113 $\pm$ 0,018 ^{Aa}
	28	0,030 $\pm$ 0,020 ^{Bb}	0,109 $\pm$ 0,029 ^{Aa}	0,095 $\pm$ 0,011 ^{Aa}	0,124 $\pm$ 0,040 ^{Aa}
Coesividade	1	0,760 $\pm$ 0,045 ^{Aa}	0,778 $\pm$ 0,093 ^{Ab}	0,747 $\pm$ 0,243 ^{Aa}	0,689 $\pm$ 0,183 ^{Aa}
	14	0,691 $\pm$ 0,230 ^{Ba}	0,756 $\pm$ 0,252 ^{ABab}	0,628 $\pm$ 0,280 ^{Ba}	0,740 $\pm$ 0,219 ^{Aa}
	28	0,855 $\pm$ 0,127 ^{Ba}	0,886 $\pm$ 0,195 ^{Aa}	0,662 $\pm$ 0,353 ^{Ab}	0,687 $\pm$ 0,219 ^{ABa}
Elasticidade	1	80,72 $\pm$ 10,56 ^{Bb}	87,61 $\pm$ 9,39 ^{ABa}	95,34 $\pm$ 14,73 ^{ABb}	96,19 $\pm$ 13,37 ^{Aa}
	14	79,79 $\pm$ 25,52 ^{Ab}	84,15 $\pm$ 30,04 ^{Aa}	93,83 $\pm$ 9,43 ^{Ab}	85,90 $\pm$ 30,31 ^{ABb}
	28	85,40 $\pm$ 15,82 ^{Ba}	92,90 $\pm$ 15,24 ^{Aa}	109,97 $\pm$ 15,99 ^{Aa}	87,84 $\pm$ 9,41 ^{ABb}
Gomosidade (N)	1	0,009 $\pm$ 0,006 ^{Aa}	0,013 $\pm$ 0,010 ^{Aa}	0,014 $\pm$ 0,005 ^{Aa}	0,020 $\pm$ 0,009 ^{Aa}
	14	0,014 $\pm$ 0,007 ^{Aa}	0,020 $\pm$ 0,012 ^{Aa}	0,015 $\pm$ 0,009 ^{Aa}	0,011 $\pm$ 0,008 ^{Aa}
	28	0,016 $\pm$ 0,010 ^{Aa}	0,022 $\pm$ 0,013 ^{Aa}	0,017 $\pm$ 0,013 ^{Aa}	0,020 $\pm$ 0,014 ^{Aa}

Resultados expressos como média de dois lotes $\pm$ DP. Letras maiúsculas sobrescritas distintas na mesma linha indicam diferenças significativas ($p < 0,05$) entre as diferentes formulações de leites fermentados para um mesmo dia de armazenamento. Letras minúsculas sobrescritas distintas na mesma coluna indicam diferenças significativas ($p < 0,05$) entre os diferentes dias de armazenamento para uma mesma formulação e mesmo parâmetro analisado. F0: formulação sem adição de resíduo de acerola (RA); F2: 2% de RA; F5: 5% de RA; F10: 10% de RA.

A estrutura de gel, formada em leites fermentados, é resultado da agregação de caseína após uma queda de pH, devido à liberação de ácidos, produzidos durante a fermentação do leite pela cultura starter. A firmeza do gel depende, principalmente, da força da rede de proteínas do leite, que pode ser influenciada pelo teor de sólidos totais, tratamento térmico, taxa de acidificação, tipo de cultura starter empregada, condições de incubação e atividade proteolítica. A adição de fibras ao produto pode induzir a mudanças na capacidade de retenção de água, alterando a estrutura e, conseqüentemente, a textura do mesmo (SAH et al.,

2016; COSTA et al., 2015; BEDANI et al., 2013; ESPÍRITO-SANTO et al., 2012; DOMAGALA, 2009).

A firmeza e a gomosidade mantiveram-se estáveis ($p > 0,05$) ao longo do período de armazenamento, em todas as formulações, e os outros parâmetros tiveram pouca ou nenhuma alteração significativa. A estabilidade do perfil de textura é desejável, para manter as propriedades físico-químicas e sensoriais de um produto, melhorando assim a sua aceitação pelo consumidor (BEDANI et al., 2013).

No primeiro dia de armazenamento refrigerado (dia 1), todas as formulações mostraram-se iguais significativamente ($p > 0,05$), em todos os parâmetros analisados, exceto elasticidade, que se mostrou maior significativamente ($p < 0,05$) em F10 quando comparado ao controle (F0). Porém, essa diferença não se manteve durante a vida de prateleira dos produtos, pois todos apresentaram valores de elasticidade e coesividade bem próximos uns aos outros. Este fato pode ser explicado pelo teor próximo de proteínas que eles possuem, já que estes parâmetros são influenciados pelas ligações de caseína (COSTA et al., 2015).

O pó de RA pode ter contribuído para manter a adesividade dos produtos, pois a formulação controle, sem adição de RA, foi a única que apresentou queda deste parâmetro durante a vida de prateleira. A adesividade é descrita como o trabalho para superar a força de atração entre os sólidos, que entram em contato uns com os outros no produto. Portanto, este parâmetro está diretamente relacionado com o teor de sólidos totais do produto, assim como com o teor de proteínas totais (DOMAGALA, 2009). Bedani et al. (2013) também observaram maiores valores para adesividade em iogurtes adicionados de farinha de okara, quando comparados com as formulações controle.

No presente trabalho, esperava-se que a adição de pó de subprodutos de acerola nos leites fermentados pudesse produzir maiores efeitos nos parâmetros de textura instrumental, particularmente na firmeza. Porém, uma maior firmeza de produtos lácteos fermentados está relacionada com alguns fatores, entre eles um tempo de fermentação mais longo (SAH et al., 2016; DAMIN et al., 2008). Em nosso estudo, o tempo de fermentação variou entre 1 hora e 35 minutos a 3 horas e 55 minutos, tempo relativamente curto. Além disso, o baixo teor de gordura (menor que 1%, neste caso) das formulações também pode ter interferido na firmeza, devido à rede mais fraca do gel proteico (ESPÍRITO-SANTO et al., 2012). Outro fator que pode ter diminuído a firmeza dos produtos foi a agitação a que foram submetidos antes do envase, que fez com que o gel se rompesse (DOMAGALA, 2009).

4.3. Impacto das condições gastrointestinais, simuladas *in vitro*, sobre as cepas probióticas e os compostos fenólicos dos leites fermentados

As populações de bactérias probióticas, *B. animalis* Bb-12 e *L. acidophilus* La-5, dos leites fermentados F0, F2, F5 e F10, submetidas a condições gástricas e entéricas simuladas *in vitro*, no 7º e no 28º dia de armazenamento sob refrigeração (4 ± 1 °C), são apresentadas na **Figura 7**.

Figura 7. Populações de *B. animalis* subsp *lactis* Bb-12 e *L. acidophilus* La-5, obtidas para os leites fermentados, antes (■) de iniciar a simulação da digestão *in vitro*, e após a fase gástrica (◐), realizada no 7º dia e no 28º dia de armazenamento sob refrigeração (4 ± 1 °C). Letras minúsculas distintas indicam diferenças significativas ($p < 0,05$) entre as formulações de leites fermentados para a mesma fase. Letras maiúsculas distintas indicam diferenças significativas ($p < 0,05$) entre os diferentes dias de armazenamento para a mesma fase de uma mesma formulação. nd: valores abaixo do limite de detecção do método utilizado. F0: sem adição de resíduo de acerola (RA); F2: 2% de RA; F5: 5% de RA; F10: 10% de RA.

Antes de iniciar o ensaio do 7º dia de armazenamento, a formulação controle (F0) apresentava as maiores contagens de bifidobactérias, e menores de lactobacilos. Após 2 horas do início do ensaio, que corresponde à passagem pelo estômago (fase gástrica), observou-se queda de 3 a 4 ciclos logarítmicos em ambas as cepas, para todas as formulações de leites fermentados, sendo que a maior queda foi observada nas populações de *B. animalis* da formulação F0 (de 9,15 log UFC/g para 5,26 log UFC/g) ($p < 0,05$). Não houve diferenças significativas ($p > 0,05$) entre as formulações nas populações sobreviventes de *B. animalis*

Bb-12 e *L. acidophilus* La-5. No ensaio do 28º dia, também se observou queda, após a fase gástrica, nas populações de *B. animalis*, entre 4 e 5 log UFC/g, em todas as formulações, sendo que, novamente, F0 sofreu a maior queda (-5 log UFC/g) ($p < 0,05$).

Não foi possível detectar populações de *L. acidophilus* nas formulações F0, F2 e F5, no ensaio do 28º dia, após a fase gástrica. Apenas a formulação F10 apresentou contagens, mas com queda de 8,3 para 4,0 log UFC/g. Resultados semelhantes aos observados neste estudo, foram relatados por Buriti, Castro e Saad (2010), onde populações de *L. acidophilus* de mousses de goiaba simbióticos, sofreram quedas de 4 a 6 ciclos logarítmicos após a fase gástrica (7º dia de armazenamento). No 28º dia, após a fase gástrica, as contagens ficaram abaixo de 3 log UFC/g, sendo que em uma das formulações, não foi detectada a cepa em questão, e após a fase entérica 1, a cepa praticamente desapareceu em todas as formulações.

Quedas expressivas em populações de *Lactobacillus*, após contato com os ácidos estomacais (pH ~ 2), em modelos de digestão *in vitro*, foram observadas em outros estudos: Succi et al. (2017) observaram queda de 4 ciclos logarítmicos em populações de *L. rhamnosus* e *L. paracasei*, tendo como matriz o chocolate; Klu e Chen (2015) observaram queda de 4 a 7 log UFC em populações de *Lactobacillus* de margarinas probióticas (amostra controle); Bedani et al. (2013) relataram queda de 3 a 4 log UFC em populações de *L. acidophilus*, tendo como matrizes iogurtes de soja com farinha de okara e polpa de frutas.

Não foram detectadas contagens de *B. animalis* e *L. acidophilus* após 4 e 6 horas de ensaio, ou seja, após as fases entéricas 1 e 2, respectivamente. Outros estudos mostraram o desaparecimento de cepas probióticas após a fase entérica (MADUREIRA et al., 2011; BURITI; CASTRO; SAAD, 2010). Algumas populações bacterianas, quando expostas ao estresse das condições gastrointestinais, entram em um estado “viável, mas não cultivável” (SUCCI et al., 2017; POSSEMIERS et al., 2010), e em alguns casos, elas podem se recuperar, retornando para a forma cultivável sob condições intestinais (RANADHEERA et al., 2012; LO-CURTO et al., 2011; BURITI; CASTRO; SAAD, 2010). Além disso, mudanças na funcionalidade celular podem ocorrer sem serem detectadas pela técnica de cultivo utilizando placas de ágar, pois é relativamente limitada (SUCCI et al., 2017; POSSEMIERS et al., 2010). Uma possível solução seria a quantificação através de técnicas moleculares (qPCR com PMA), que conseguem omitir células mortas e identificar células viáveis, porém não cultiváveis (PADILHA et al., 2016; VILLARREAL et al., 2013).

A resistência à acidez gástrica e aos sais biliares são, atualmente, os testes *in vitro* mais utilizados, de acordo com as diretrizes para a avaliação de probióticos em alimentos

(FAO/WHO, 2002). No entanto, a resistência avaliada em modelos de digestão *in vitro*, não indica habilidade de colonização efetiva no intestino (SUCCI et al., 2017). Além disso, segundo revisão realizada por Adams (2010), muitos dos efeitos obtidos a partir de células viáveis de probióticos também são obtidos a partir de populações de células mortas. Bifidobactérias mortas podem estimular o sistema imunológico gastrointestinal, induzindo a aumentos significativos na produção de TNF- α . O autor afirma que, tanto células vivas como mortas, em produtos probióticos, podem gerar respostas biológicas benéficas. Enquanto as células probióticas vivas influenciam a microbiota intestinal e a resposta imune, os componentes das células mortas exercem uma resposta antiinflamatória no trato gastrointestinal.

Pesquisadores sugerem que a tolerância dos probióticos ao pH gástrico e aos sais biliares pode ser influenciada pelos alimentos transportadores, ou seja, pela matriz alimentar (SUCCI et al., 2017; PADILHA et al., 2016; KLU et al., 2015; RANADHEERA et al., 2012). Estudo realizado por Madureira et al. (2011) constatou que populações de *L. acidophilus*, *L. casei* e *B. animalis*, quando expostas a condições estomacais simuladas *in vitro*, sofreram menores quedas quando incorporadas a queijos do que em caldo MRS. Meira et al. (2015) realizaram teste parecido, quando monitoraram contagens de *L. acidophilus* La-5 e *B. animalis* Bb-12, em caldo MRS e em ricota de leite de cabra, após digestão simulada *in vitro*. Antes do início do teste, as cepas apresentavam contagens de 6 log UFC/g, e ao final, as populações de *L. acidophilus* se mantiveram nas duas matrizes, porém, as de *B. animalis* sofreram queda de 4 ciclos de log na matriz MRS. Possemiers et al. (2010) observaram uma viabilidade 5 vezes maior de *L. helveticus* e *B. longum* quando as bactérias foram administradas em chocolate, comparado com o leite de vaca, em Simulador do Ecossistema Microbiano Intestinal Humano (SHIME).

Devido às maiores quedas de populações sofridas pela formulação F0, observadas no presente estudo, e ao fato de a formulação F10 ser a única a apresentar contagens de *L. acidophilus* após a fase gástrica simulada *in vitro*, podemos sugerir que a presença do pó de subprodutos de acerola, devido aos seus compostos bioativos, e grande teor de fibras, pode ter melhorado a passagem dos microrganismos pelo trato gastrointestinal, conferindo algum tipo de “proteção” contra os ácidos e sais provenientes da digestão (SUCCI et al., 2017; PADILHA et al., 2016; LÓPEZ-NICOLÁS et al., 2014; WICHIENTHOT; JATUPORNPIPAT; RASTALL, 2010).

Entretanto, no processo de digestão gastrointestinal, a estabilidade e a absorção de compostos fenólicos também podem ser afetadas, em diferentes extensões, dependendo da matriz alimentar e das condições do lúmen, resultando em uma grande proporção de polifenóis e seus metabólitos não absorvidos (LÓPEZ-NICOLÁS et al., 2014; CORREA-BETANZO et al., 2014; SENGUL; SUREK; NILUFER-ERDIL, 2014; FRONTELA et al., 2011). Nesse sentido, para que os compostos fenólicos presentes nos leites fermentados F2, F5 e F10, sejam capazes de exercer possíveis efeitos positivos sobre a saúde, faz-se necessário avaliar sua bioacessibilidade. A bioacessibilidade é definida como a quantidade de um composto ingerido que é liberada da matriz alimentar, estando disponível para absorção intestinal, atingindo, em seguida, a circulação sistêmica (GAYOSO et al., 2016; TENORE et al., 2013). Portanto, o trato gastrointestinal pode atuar como um “extrator”, onde os polifenóis são progressivamente liberados da matriz alimentar e disponibilizados para absorção, exercendo seus efeitos biológicos (TAGLIAZUCCHI et al., 2010).

Na **Tabela 11**, podemos observar os principais flavonoides identificados via CLAE nos leites fermentados adicionados de RA (F2, F5 e F10), com suas respectivas quantidades, no 7º e no 28º dia de armazenamento sob refrigeração (4 ± 1 °C), em diferentes tempos, conforme a seguir: T0: flavonoides encontrados no produto, antes da digestão *in vitro*; T1: flavonoides encontrados após a fase gástrica simulada; T3: flavonoides encontrados após a fase entérica 2 simulada (final do experimento).

Tabela 11. Quantificação dos principais flavonoides encontrados nos leites fermentados adicionados de pó de subprodutos de acerola, antes, durante e após digestão simulada *in vitro*.

FLAVONOIDES (µg/g de produto)	Amostra	Dia 7*			Dia 28*		
		T0	T1	T3	T0	T1	T3
Quercetina-3-ramnose	F2	2,11	4,63	4,82	1,10	1,99	3,03
	F5	1,22	3,26	4,69	1,48	3,51	5,61
	F10	2,25	6,73	10,91	5,69	4,23	9,88
Rutina	F2	0,31	0,40	0,44	0,10	0,19	0,21
	F5	0,16	0,28	0,33	0,18	0,33	0,32
	F10	0,27	0,70	0,84	0,71	0,44	0,69
Derivados de Quercetina	F2	0,87	1,01	0,85	0,36	0,45	0,50
	F5	0,49	0,81	0,98	0,66	0,95	0,76
	F10	1,08	2,27	1,63	2,98	1,37	1,36
Derivado de Caempferol	F2	0,08	0,16	0,23	0,04	0,08	0,14
	F5	0,04	0,10	0,21	0,05	0,12	0,24
	F10	0,07	0,20	0,52	0,17	0,15	0,41

Derivado de Cianidina	F2	nd	0,03	0,02	nd	0,01	nd
	F5	nd	0,04	0,03	nd	0,04	nd
	F10	0,04	0,12	0,08	0,12	0,04	0,05

Resultados expressos como média. T0: antes da digestão *in vitro*; T1: após fase gástrica; T3: após fase entérica 2 (final do ensaio). * Análise realizada nos dias 7 e 28 de armazenamento sob refrigeração (4 ± 1 °C). F0: sem adição de resíduo de acerola (RA); F2: 2% de RA; F5: 5% de RA; F10: 10% de RA. nd: não detectado.

Os principais flavonoides identificados nos leites fermentados probióticos adicionados de RA, foram: quercetina-3-ramnose, rutina, derivados de quercetina, derivado de caempferol e derivado de cianidina. Estes achados corroboram com os resultados obtidos para o pó de RA (vide **Figura 3**), mostrando que os flavonoides se mantiveram nos produtos finais, ao longo do período de armazenamento sob refrigeração (28 dias; 4 ± 1 °C). Os perfis cromatográficos (270 nm), obtidos via CLAE para os leites fermentados F2, F5 e F10, nos três diferentes tempos analisados, encontram-se na **Figura 8**.

Figura 8. Perfis cromatográficos (270 nm) de flavonoides dos leites fermentados, no 7º dia de armazenamento sob refrigeração (4 ± 1 °C). T0: antes da digestão *in vitro*; T1: após fase gástrica; T3: após fase entérica 2 (final do ensaio). F2: 2% de resíduo de acerola (RA); F5: 5% de RA; F10: 10% de RA. (1) quercetina-3-ramnose, (2) rutina, (3) derivados de quercetina, (4) derivado de caempferol e (5) derivado de cianidina.

Conforme podemos observar, todos os flavonoides foram afetados pelo processo de digestão simulada *in vitro*, sendo que a maior parte deles aumentou significativamente ($p < 0,05$) após a fase gástrica. Após a fase entérica 2 (final do ensaio), alguns mantiveram-se estáveis, enquanto outros aumentaram ou sofreram degradação. Quercetina-3-Ramnose é o flavonoide mais abundante, tendo aumentado em torno de 2 a 5 vezes após a digestão simulada *in vitro*. Rutina e outros derivados de quercetina, de modo geral, mantiveram-se estáveis até o final do ensaio.

De acordo com Tenore et al. (2013), alguns glicosídeos de flavonoides parecem ter uma boa estabilidade em meio ácido gástrico, mas possuem grande instabilidade às condições alcalinas do intestino. Quercetina e seus derivados, incluindo a rutina, costumam ser estáveis às condições gastrointestinais (CORREA-BETANZO et al., 2014; LÓPEZ-NICOLÁS et al., 2014; BOUAYED et al., 2012; TAGLIAZUCCHI et al., 2010), mas algumas pesquisas mostram pequenas perdas, especialmente em meio alcalino (GAYOSO et al., 2016; TENORE et al., 2013).

Uma possível explicação é que esses compostos tendem a interagir com enzimas digestivas, e com isso, podem ser mascarados na análise por CLAE. Polifenóis ligados a uma porção de ramnose, por exemplo, ao atingir o cólon, são hidrolisados por rhamnosidases, antes da absorção (GAYOSO et al., 2016; TENORE et al., 2013; TAGLIAZUCCHI et al., 2010). Além disso, Chen et al. (2016) mencionaram que a instabilidade em condições alcalinas pode ser atribuída às mudanças que os compostos fenólicos sofrem durante a digestão, tais como oxidação, polimerização e biotransformação. Além disso, as interações com os constituintes da matriz alimentar, como íons metálicos, proteínas e fibras, causam mudanças no seu peso molecular, solubilidade e estrutura química (LUCAS-GONZALEZ et al., 2016).

O derivado de cianidina identificado nos leites fermentados é o composto menos abundante, não sendo possível detectá-lo em algumas fases. As antocianinas são, geralmente, consideradas compostos muito instáveis, e frequentemente sofrem degradação à medida que o pH do meio muda de ácido (pH ~ 2) para alcalino (pH ~ 8). Assim como outros compostos fenólicos, como ácido cafeico e ácido rosmarínico, são altamente sensíveis às condições alcalinas presentes no intestino delgado, que é o local onde a maioria dos polifenóis são degradados ou transformados em outros compostos. A estabilidade das antocianinas, *in vitro*, depende de diversos fatores, entre eles a natureza e o número de açúcares e de ácidos ligados à aglicona. No entanto, as interações das antocianinas com componentes da matriz alimentar,

como pectina e outras fibras, podem aumentar significativamente a biodisponibilidade destas no cólon, aonde tais carboidratos são degradados, podendo, assim, exercer seus efeitos protetores. (GAYOSO et al., 2016; LUCAS-GONZALEZ et al., 2016; CORREA-BETANZO et al., 2014).

O derivado de caempferol encontrado em todas as formulações aumentou gradativamente durante o ensaio. Entretanto, em revisão realizada por Chen e Chen (2013), os autores afirmam que a biodisponibilidade de caempferol é muito baixa. Por outro lado, parece que este composto melhora a biodisponibilidade de substâncias destinadas a combater o câncer, pois pode modular uma série de elementos-chave nas vias de transdução de sinais celulares ligados à apoptose, angiogênese, inflamação e metástase. A combinação de caempferol com quercetina, por exemplo, parece aumentar os efeitos anticancerígenos da quercetina (LIMTRAKUL; KHANTAMAT; PINTHA, 2005).

No presente estudo, a matriz alimentar influenciou positivamente a bioacessibilidade dos compostos fenólicos encontrados, pois poucos sofreram degradação no processo de digestão simulada *in vitro*. Além disso, há grandes chances de os polifenóis interagirem com os microrganismos probióticos após a digestão. De acordo com revisão realizada por Wang et al. (2016), a absorção de quercetina e seus conjugados ocorre no intestino grosso, e os metabolitos formados pelos microrganismos do cólon são absorvidos e transportados através da veia porta para o fígado, podendo exercer seus efeitos positivos em diversos órgãos do corpo humano.

5. CONCLUSÃO

O resíduo desidratado de acerola demonstrou ser excelente fonte de compostos fenólicos, superior ao resíduo de laranja, além de apresentar expressiva atividade antioxidante *in vitro* e elevada concentração de vitamina C. Ambos os resíduos são fontes de fibras alimentares e proteínas, e ricos em magnésio, cálcio, potássio e fósforo. Sendo assim, representam valiosos ingredientes na elaboração de alimentos funcionais, pois além de promoverem a saúde, podem atuar como antioxidantes naturais, prevenindo a peroxidação lipídica. A utilização destes resíduos pelas indústrias de alimentos pode ainda colaborar com a sustentabilidade do planeta, pois ajuda a minimizar o impacto ambiental.

Com relação aos leites fermentados adicionados de resíduo de acerola, estes mantiveram suas populações de bactérias probióticas satisfatórias, mantendo-as em torno de 8 log UFC/g até o final da vida de prateleira. A cor e a textura instrumentais, de modo geral, também se mantiveram estáveis durante o armazenamento sob refrigeração (4 ± 1 °C; 28 dias). Os principais flavonoides encontrados nos leites fermentados adicionados de resíduo de acerola aumentaram quantitativamente após a digestão simulada *in vitro*. Sendo assim, além dos componentes nutricionais comuns, como proteínas e vitaminas, naturalmente presentes em produtos à base de leite de vaca, e dos efeitos funcionais que as bactérias probióticas utilizadas comprovadamente exercem no organismo humano, estes produtos têm potencial atividade antioxidante, entre outras associadas aos compostos fenólicos.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABUD, A. K. S.; NARAIN, N. Incorporação da farinha de resíduo do processamento de polpa de fruta em biscoitos: uma alternativa de combate ao desperdício. **Brazilian Journal of Food Technololy**, v. 12 (4), p. 257-265, 2009.
- ADAMS, C. A. The probiotic paradox: live and dead cells are biological response modifiers. **Nutrition Research Reviews**, v. 23, p. 37–46, 2010.
- AGIL, R.; HOSSEINIAN, F. Dual Functionality of Triticale as a Novel Dietary Source of Prebiotics with Antioxidant Activity in Fermented Dairy Products. **Plant Foods for Human Nutrition**, v. 67, p. 88–93, 2012.
- AGUEDO, M.; KOHNEN, S.; RABETAFIKA, N.; BOSSCHE, S. V.; STERCKX, J.; BLECKER, C.; BEAUVE, C.; PAQUOT, M. Composition of by-products from cooked fruit processing and potential use in food products. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 27, p. 61–69, 2012.
- AGUIAR, T. M.; RODRIGUES, F. S.; SANTOS, E. R.; SABAA-SRUR, A. U. O. Caracterização química e avaliação do valor nutritivo de sementes de acerola. **Nutrire: Journal of the Brazilian Society for Food and Nutrition**, São Paulo, SP, v. 35, n. 2, p. 91-102, 2010.
- AJILA, C. M.; BRAR, S. K.; VERMA, M.; TYAGI, R. D.; VALÉRO, J. R. Solid-state fermentation of apple pomace using *Phanerocheate chrysosporium* – liberation and extraction of phenolic antioxidants. **Food Chemistry**, v. 126 (3), p. 1071–1080. 2011.
- ANSARI, M. A.; ABDUL, H. M.; JOSHIA, G.; OPII, W. O.; BUTTERFIELD, A. Protective effect of quercetin in primary neurons against A β (1–42): relevance to Alzheimer's disease. **Journal of Nutritional Biochemistry**, v. 20, p. 269–275, 2009.
- ANVISA – AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. **Alimentos com alegações de propriedades funcionais e/ou de saúde, novos alimentos/ingredientes, substâncias bioativas e probióticos**. 2008. Disponível em: http://www.anvisa.gov.br/alimentos/comissoes/tecno_lista_alega.htm. Acesso em: 10 set. 2015.
- ANVISA – AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. **Regulamento técnico que estabelece as diretrizes básicas para análise e comprovação de propriedades funcionais e ou de saúde alegadas em rotulagem de alimentos**. Resolução n° 18, de 30 de abril de 1999.
- ANVISA – AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. **Regulamento técnico sobre a ingestão diária recomendada (IDR) de proteína, vitaminas e minerais**. Resolução RDC n° 269, de 22 de setembro de 2005.
- AOAC - ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS. **Official methods of analysis of AOAC International** (18ª ed.) Whashington: AOAC, 2005.
- ARABBI, P. R.; GENOVESE, M. I.; LAJOLO, F. M. Flavonoids in vegetable foods commonly consumed in Brazil and estimated ingestion by the Brazilian population. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 52, p. 1124-1131, 2004.
- ASSINI, J. M.; MULVIHILL, E. E.; HUFF, M. W. Citrus flavonoids and lipid metabolism. **Current Opinion in Lipidology**, v. 40, p. 24-34, 2013.
- AYALA-ZAVALA, J. F.; VEGA-VEGA, V.; ROSAS-DOMÍNGUEZ, C.; PALAFOX-CARLOS, H.; VILLA-RODRIGUEZ, J. A.; WASIM-SIDDIQUI, M.; DÁVILA-AVIÑA, J. E.; GONZÁLEZ-AGUILAR, G. A. Agro-industrial potential of exotic fruit byproducts as a source of food additives. **Food Research International**, v. 44, p. 1866–1874, 2011.

- BARROS, H. R. M.; FERREIRA, T. A.; GENOVESE, M. I. Antioxidant capacity and mineral content of pulp and peel from commercial cultivars of citrus from Brazil. **Food Chemistry**, v. 134, p. 1892-1898, 2012.
- BASTOS, D. H. M.; ROGERO, M. M.; ARÊAS, J. A. G. Mecanismos de ação de compostos bioativos dos alimentos no contexto de processos inflamatórios relacionados à obesidade. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia**, v. 53, p. 646-656, 2009.
- BATAGLION, G. A.; SILVA, F. M. A.; EBERLIN, M. N.; KOOLEN, H. H. F. Determination of the phenolic composition from Brazilian tropical fruits by UHPLC-MS/MS. **Food Chemistry**, v. 180, p. 280-287, 2015.
- BEDANI, R.; CAMPOS, M. M. S.; CASTRO, I. A.; ROSSI, E. A.; SAAD, S. M. I. Incorporation of soybean by-product okara and inulin in a probiotic soy yoghurt: texture profile and sensory acceptance. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 94, p. 119-125, 2014.
- BEDANI, R.; ROSSI, E. A.; SAAD, S. M. I. Impact of inulin and okara on *Lactobacillus acidophilus* La-5 and *Bifidobacterium animalis* Bb-12 viability in a fermented soy product and probiotic survival under in vitro simulated gastrointestinal conditions **Food Microbiology**, v. 34, 382-389, 2013.
- BENZIE, I. F. F.; STRAIN, J. J. The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of "antioxidant power": the FRAP assay. **Analytical Biochemistry**, v. 239, p. 70-76, 1996.
- BERMEJO, A.; LLOSA, M. J.; CANO, A. Analysis of Bioactive Compounds in Seven Citrus Cultivars. **Food Science and Technology International**, v. 17(1), p. 0055-8, 2011.
- BERTOLINO, M.; BELVISO, S.; BELLO, B. D.; GHIRARDELLO, D.; GIORDANO, M.; ROLLE, L.; GERBI, V.; ZEPPA, G. Influence of the addition of different hazelnut skins on the physicochemical, antioxidant, polyphenol and sensory properties of yogurt. **LWT - Food Science and Technology**, v. 63, p. 1145-1154, 2015.
- BHANGER, M. I.; IQBAL, S.; ANWAR, F.; IMRAN, M.; AKHTAR, M.; ZIA-UL-HAQ, M. Antioxidant potential of rice bran extracts and its effects on stabilization of cookies under ambient storage. **International Journal of Food Science & Technology**, v. 43 (5), p. 779-786, 2008.
- BIALONSKA, D.; RAMNANI, P.; KASIMSETTY, S. G.; MUNTHA, K. R.; GIBSON, G. R.; FERREIRA, D. The influence of pomegranate by-product and punicalagins on selected groups of human intestinal microbiota. **International Journal of Food Microbiology**, v. 140, p. 175-182, 2010.
- BORGES, K. C. **Estudo das características físico-químicas e funcionalidade de bagaços de frutas tropicais desidratados em leite de jorro**. Rio Grande do Norte, 2011. 156 p. Dissertação (Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química) – Universidade Federal do Rio Grande do Norte (UFRN).
- BOUAYED, J.; DEUBER, H.; HOFFMANN, L.; BOHN, T. Bioaccessible and dialysable polyphenols in selected apple varieties following *in vitro* digestion vs. their native patterns. **Food Chemistry**, v. 131, p. 1466-1472, 2012.
- BRAND-WILLIAMS, W.; CUVELIER, M. E.; BERSET, C. Use of a Free Radical Method to Evaluate Antioxidant Activity. **Lebensmittel-Wissenschaft & Technologie**, v. 28, p. 25-30, 1995.
- BURITI, F. C. A.; CASTRO, I. A.; SAAD, S. M. I. Viability of *Lactobacillus acidophilus* in symbiotic guava mousses and its survival under *in vitro* simulated gastrointestinal conditions. **International Journal of Food Microbiology**, v. 137, p. 121-129, 2010.
- CARDARELLI, H. R.; BURITI, F. C. A.; CASTRO, I. A.; SAAD, S. M. I. Inulin and oligofructose improve sensory quality and increase the probiotic viable count in potentially symbiotic *petit-suisse* cheese. **LWT- Food Science and Technology**, v. 41, p. 1037-1046, 2008.

- CARDOSO, P. C.; TOMAZINI, A. P. B.; STRINGHETA, P. C.; RIBEIRO, S. M. R.; PINHEIRO-SANT'ANA, H. M. Vitamin C and carotenoids in organic and conventional fruits grown in Brazil. **Food Chemistry**, v. 126, p. 411–416, 2011.
- CASAROTTI, S. N.; PENNA, A. L. B. Acidification profile, probiotic in vitro gastrointestinal tolerance and viability in fermented milk with fruit flours. **International Dairy Journal**, v. 41, p. 1-6, 2015.
- CHEBROLU, K. K.; JAYAPRAKASHA, G. K.; YOO, K. S.; JIFON, J. L.; PATIL, B. S. An improved sample preparation method for quantification of ascorbic acid and dehydroascorbic acid by HPLC. **Food Science and Technology**, v. 47, p. 443-449, 2012.
- CHEN, G.; CHEN, S.; CHEN, F.; XIE, Y.; HAN, M.; LUO, C.; ZHAO, Y.; GAO, Y. Nutraceutical potential and antioxidant benefits of selected fruit seeds subjected to an *in vitro* digestion. **Journal of Functional Foods**, v. 20, p. 317–331, 2016.
- CHEN, A. Y.; CHEN, Y. C. A review of the dietary flavonoid, kaempferol on human health and cancer chemoprevention. **Food Chemistry**, v. 138, p. 2099-2107, 2013.
- CHTOUROU, Y.; FETOUI, H.; JEMAI, R.; SLIMA, A. B.; MAKNI, M.; GDOURA, R. Naringenin reduces cholesterol-induced hepatic inflammation in rats by modulating matrix metalloproteinases-2, 9 via inhibition of nuclear factor kB pathway. **European Journal of Pharmacology**, v. 746, p. 96–105, 2015b.
- CHTOUROU, Y.; SLIMA, A. B.; MAKNI, M.; GDOURA, R.; FETOUI, H. Naringenin protects cardiac hypercholesterolemia-induced oxidative stress and subsequent necroptosis in rats. **Pharmacological Reports**, v. 67, p. 1090–1097, 2015a.
- CÓRDOVA, K. R. V.; GAMA, T. M. M. T. B.; WINTER, C. M. G.; NETO, G. K.; FREITAS, R. J. S. Características físico-químicas da casca do maracujá amarelo (*Passiflora edulis* Flavicarpa Degener) obtida por secagem. **Boletim do Centro de Pesquisa de Processamento de Alimentos**, Curitiba, v. 23 (2), p. 221-230, 2005.
- CORREA-BETANZO, J.; ALLEN-VERCOE, E.; MCDONALD, J.; SCHROETER, K.; CORREDIG, M.; PALIYATH, G. Stability and biological activity of wild blueberry (*Vaccinium angustifolium*) polyphenols during simulated *in vitro* gastrointestinal digestion. **Food Chemistry**, v. 165, p. 522–53, 2014.
- CORREIA, R. T. P.; BORGES, K. C.; MEDEIROS, M. F.; GENOVESE, M. I. Bioactive compounds and phenolic-linked functionality of powdered tropical fruit residues. **Food Science and Technology International**, v. 18 (6), p. 539–547, 2012.
- COSTA, M. P.; FRASAO, B. S.; SILVA, A. C. O.; FREITAS, M. Q.; FRANCO, R. M.; CONTE-JUNIOR, C. A. Cupuassu (*Theobroma grandiflorum*) pulp, probiotic, and prebiotic: Influence on color, apparent viscosity, and texture of goat milk yogurts. **Journal of Dairy Science**, v. 98, p. 5995–6003, 2015.
- COZZOLINO, S. M. F. **Biodisponibilidade de nutrientes**, Barueri: Manole, p. 354-373, 2009.
- CRIZEL, T. M.; JABLONSKI, A.; RIOS, A. O.; RECH, R.; FLÔRES, S. H. Dietary fiber from orange byproducts as a potential fat replacer. **Food Science and Technology**, v. 53, p. 9-14, 2013.
- CROZIER, A.; JAGANATH, I.B.; CLIFFORD, M.N. Dietary phenolics: bioavailability and effects on health. **Natural Product Reports**, v. 26, p. 1001-1043, 2009.
- D'ANDREA, G. Quercetin: A flavonol with multifaceted therapeutic applications? **Fitoterapia**, v. 106, p. 256–271, 2015.
- DAMIN, M. R.; MINOWA, E.; ALCÂNTARA, M. R.; OLIVEIRA, M. N. Effect of cold storage on culture viability and some rheological properties of fermented milk prepared with yogurt and probiotic bacteria. **Journal of Texture Studies**, v. 39, p. 40-55, 2008.

- DAO, T.M.; WAGET, A.; KLOPP, P.; SERINO, M.; VACHOUX, C.; PECHERE, L.; DRUCKER, D.J.; CHAMPION, S.; BARTHELEMY, S.; BARRA, Y.; BURCELIN, R.; SEREE, E. Resveratrol increases glucose induced GLP-1 secretion in mice: a mechanism which contributes to the glycemic control. **Plos One**, v. 6 (6), 2011.
- DEL RIO, D.; RODRIGUEZ-MATEOS, A.; SPENCER, J.P.E.; TOGNOLINI, M.; BORGES, G.; CROZIER, A. Dietary (poly)phenolics in human health: structures, bioavailability, and evidence of protective effects against chronic diseases. **Antioxidants and Redox Signaling**, v. 18, n. 14, 2013.
- DEVARAJAN, S.; VENUGOPAL, S. Antioxidant and α -amylase inhibition activities of phenolic compounds in the extracts of Indian honey. **Chinese Journal of Natural Medicines**, v. 10, p. 255-259, 2012.
- DJERIDANE, A.; HAMDI, A.; BENSANIA, W.; CHEIFA, K.; LAKHDARI, I.; YOUSFI, M. The *in vitro* evaluation of antioxidative activity, α -glucosidase and α -amylase enzyme inhibitory of natural phenolic extracts. **Diabetes and Metabolic Syndrome Clinical Research and Reviews**, 2013.
- DOMAGALA, J. Instrumental Texture, Syneresis and Microstructure of Yoghurts Prepared from Goat, Cow and Sheep Milk. **International Journal of Food Properties**, v. 12 (3), p. 605-615, 2009.
- DONKOR, O. N.; HENRIKSSON, A.; VASILJEVIC, T.; SHAH, N. P. Effect of acidification on the activity of probiotics in yoghurt during cold storage. **International Dairy Journal**, v. 16, p. 1181-1189, 2006.
- DUARTE-ALMEIDA, J. M.; SANTOS, R. J.; GENOVESE, M. I.; LAJOLO, F. Avaliação da atividade antioxidante utilizando sistema β -caroteno/ácido linoléico e método de sequestro de radicais DPPH. **Ciência e Tecnologia de Alimentos (Campinas)**, v. 26, n. 2, p. 446-452, 2006.
- DUEÑAS, M.; MUÑOZ-GONCÁLEZ, I.; CUEVA, C.; JIMÉNEZ-GIRÓN, A.; SÁNCHEZ-PATÁN, F.; SANTOS-BUELGA, C.; MORENO-ARRIBAS, M. V.; BARTOLOMÉ, B. A Survey of Modulation of Gut Microbiota by Dietary Polyphenols. **BioMed Research International**, Article ID 850902, 15 pages, 2015.
- DUZZIONI, A.G.; LENTON, V.M.; SILVA, D.I.S.; BARROZO, M.A.S. Effect of drying kinetics on main bioactive compounds and antioxidant activity of acerola (*Malpighia emarginata* D.C.) residue. **International Journal of Food Science and Technology**, v. 48, p. 1041-1047, 2013.
- ELLEUCH, M.; BEDIGIAN, D.; ROISEUX, O.; BESBES, S.; BLECKER, C.; ATTIA, H. Dietary fibre and fibre-rich by-products of food processing: Characterization, technological functionality and commercial applications: A review. **Food Chemistry**, v. 124, p. 411-421, 2011.
- EL-SAID, M. M.; HAGGAG, H. F.; EL-DIN, H. M. F.; GAD, A. S.; FARAHAT, A. M. Antioxidant activities and physical properties of stirred yoghurt fortified with pomegranate peel extracts. **Annals of Agricultural Science**, v. 59 (2), p. 207-212, 2014.
- ESCOBEDO-AVELLANEDA, Z.; GUTIÉRREZ-URIBE, J.; VALDEZ-FRAGOSO, A.; TORRES, J. A.; WELTI-CHANESA, J. Phytochemicals and antioxidant activity of juice, flavedo, albedo and comminuted Orange. **Journal of Functional Foods**, v. 6, p. 470-481, 2014.
- ESPÍRITO-SANTO, A. P.; CARTOLANO, N. S.; SILVA, T. F.; SOARES, F. A. S. M.; GIOIELLI, L. A.; PEREGO, P.; CONVERTI, A.; OLIVEIRA, M. N. Fibers from fruit by-products enhance probiotic viability and fatty acid profile and increase CLA content in yoghurts. **International Journal of Food Microbiology**, v. 154, p. 135-144, 2012.
- ESTRADA, J. D.; BOENEKE, C.; BECHTEL, P.; SATHIVEL, S. Developing a strawberry yogurt fortified with marine fish oil. **Journal of Dairy Science**, v. 94, p. 5760-5769, 2011.

FAO/WHO - FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS; WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Food energy – methods of analysis and conversion factors**. Rome, 2002. Disponível em: www.fao.org. Acesso em: 21 set. 2015.

FAO/WHO - FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION THE UNITED NATIONS; WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Joint Working Group Report on Drafting Guidelines for the Evaluation of Probiotics in Food**, 2002. Disponível em: <ftp://ftp.fao.org/es/esn/food/wgreport2.pdf>. Acesso em: 15 mar. 2014.

FAVARO-TRINDADE, C. S.; BERNARDI, S.; BODINI, R. B.; BALIEIRO, J. C. C.; ALMEIDA, E. Sensory Acceptability and Stability of Probiotic Microorganisms and Vitamin C in Fermented Acerola (*Malpighia emarginata* DC.) Ice Cream. **Journal of Food Science**, v. 71 (6), 2006.

FERNÁNDEZ-LÓPEZ, J.; SENDRA-NADAL, E.; NAVARRO, C.; SAYAS, E.; VIUDAMARTOS, M.; ALVAREZ, J. A. P. Storage stability of a high dietary fibre powder from Orange by-products. **International Journal of Food Science and Technology**, v. 44, p. 748–756, 2009.

FRONTELA, C.; ROS, G.; MARTÍNEZ, C.; SÁNCHEZ-SILES, L. M.; CANALIA, R.; VIRGILIA, F. Stability of Pycnogenol® as an ingredient in fruit juices subjected to *in vitro* gastrointestinal digestion. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 91, p. 286–292, 2011.

GALLINA, D. A.; ALVES, A. T. S.; TRENTO, F. K. H. S.; CARUSI, J. Caracterização de Leites Fermentados Com e Sem Adição de Probióticos e Prebióticos e Avaliação da Viabilidade de Bactérias Láticas e Probióticas Durante a Vida-de-Prateleira. **UNOPAR Científica Ciências Biológicas e da Saúde**, v. 13 (4), p. 239-244, 2011.

GARCÍA-PÉREZ, F. J.; LARIO, Y.; FERNÁNDEZ-LOPEZ, J.; SAYAS, E.; PÉREZ-ALAVAREZ, J. A.; SENDRA, E. Effect of Orange Fiber Addition on Yogurt Color During - Fermentation and Cold Storage. **Industrial Applications**, v. 30 (6), p. 457-463, 2005.

GARDI, C.; BAUEROVA, K.; STRINGA, B.; KUNCIROVA, V.; SLOVAK, L.; PONIST, S.; DRAFI, F.; BEZAKOVA, L.; TEDESCO, I.; ACQUAVIVA, A.; BILOTTO, S.; RUSSO, G. L. Quercetin reduced inflammation and increased antioxidant defense in rat adjuvant arthritis. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 583, p. 150-157, 2015.

GAYOSO, L.; CLAERBOUT, A.; CALVO, M. I.; CAVERO, R. Y.; ASTIASARÁN, I.; ANSORENA, D. Bioaccessibility of rutin, caffeic acid and rosmarinic acid: Influence of the *in vitro* gastrointestinal digestion models. **Journal of Functional Foods**, v. 26, p. 428-438, 2016.

GU, L.; KELM, M. A.; HAMMERSTONE, J. F.; BEECHER, G.; HOLDEN, J.; HAYTOWITZ, D.; GEBHARDT, S.; PRIOR, R. L. Concentrations of Proanthocyanidins in Common Foods and Estimations of Normal Consumption. **The Journal of Nutrition**, v. 134, p. 613–617, 2004.

HERVERT-HERNÁNDEZ, D.; PINTADO, C.; ROTGER, R.; GONI, I. Stimulatory role of grape pomace polyphenols on *Lactobacillus acidophilus* growth. **International Journal of Food Microbiology**, v. 136, p. 119-122, 2009.

HUANG, D.; OU, B.; PRIOR, R. L. The Chemistry behind Antioxidant Capacity Assays. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, p. 53, v. 1841-1856, 2005.

IGNAT, I.; VOLF, I.; POPA, V. I. A critical review of methods for characterisation of polyphenolic compounds in fruits and vegetables. **Food Chemistry**, v. 126, p. 1821–1835, 2011.

INFANTE, J.; SELANI, M. M.; TOLEDO, N. M. V.; SILVEIRA-DINIZ, M. F.; ALENCAR, S. M.; SPOTO, M. H. F. Atividade antioxidante de resíduos agroindustriais de frutas tropicais. **ALIMENTOS E NUTRIÇÃO – Brazilian Journal of Food and Nutrition**, Araraquara, v. 24, n. 1, p. 87-91, 2013.

INSTITUTE OF MEDICINE. **Dietary Reference Intakes for Water, Potassium, Sodium, Chloride, and Sulfate**. Washington: National Academy Press, 2005. Disponível em: <http://www.nap.edu>. Acesso em: 25 set. 2015.

JAMAL, P.; IDRIS, Z. M.; ALAM, M. Z. Effects of physicochemical parameters on the production of phenolic acids from palm oil mill effluent under liquid-state fermentation by *Aspergillus niger* IBS-103ZA. **Food Chemistry**, v. 124 (4), p. 1595–1602, 2011.

JIRILLO, E.; JIRILLO, F.; MAGRONE, T. Healthy Effects Exerted by Prebiotics, Probiotics, and Symbiotics with Special Reference to their Impact on the Immune System. **International Journal for Vitamin and Nutrition Research**, v. 82 (3), p. 200–208, 2012.

JRIDI, M.; SOUISSI, N.; SALEM, M. B.; AYADI, M. A.; NASRI, M.; AZABOU, S. Tunisian date (*Phoenix dactylifera* L.) by-products: Characterization and potential effects on sensory, textural and antioxidant properties of dairy desserts. **Food Chemistry**, v. 188, p. 8–15, 2015.

KARAASLAN, M.; OZDEN, M.; VARDIN, H.; TURKOGLU, H. Phenolic fortification of yogurt using grape and callus extracts. **LWT - Food Science and Technology**, v. 44, p. 1065–1072, 2011.

KARIMI, E.; OSKOUAEIAN, E.; HENDRA, R.; OSKOUAEIAN, A.; JAAFAR, H. Z. E. Phenolic Compounds Characterization and Biological Activities of *Citrus aurantium* Bloom. **Molecules**, v. 17, p. 1203–1218, 2012.

KAROUI, I. J.; MARZOUK, B. Characterization of Bioactive Compounds in Tunisian Bitter Orange (*Citrus aurantium* L.) Peel and Juice and Determination of Their Antioxidant Activities. **BioMed Research International**, Article ID 345415, 12 pages, 2013.

KHAN, M. K.; ZILL-E-HUMA; DANGLES, O. A comprehensive review on flavanones, the major citrus polyphenols. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 33, p. 85–104, 2014.

KLU, Y. A. K.; CHEN, J. Effect of peanut butter matrices on the fate of probiotics during simulated gastrointestinal passage. **LWT - Food Science and Technology**, v. 62, p. 983–988, 2015.

KNOCKAERT, D.; VAN CAMP, J.; STRUIJS, K.; WILLE, C.; RAES, K. Potential of lactic acid fermentation to produce health beneficial compounds from vegetable waste. **FoodMicro**, p. 727–727, 2012.

KNUDSEN, A.; ZANTEN, G. C. V. JENSEN, S. L.; FORSSTEN, S. D.; SAARINEN, M.; LAHTINEN, S. J.; BANDSHOLM, O.; SVENSSON, B.; JESPERSEN, L.; BLENNOW, A. Comparative fermentation of insoluble carbohydrates in an *in vitro* human feces model spiked with *Lactobacillus acidophilus* NCFM. **Starch/Starke**, v. 65, p. 346–353, 2013.

KUSKOSKI, E. M.; ASUERO, A. G.; MORALES, M. T.; FETT, R. Frutos tropicais silvestres e polpas de frutas congeladas: atividade antioxidante, polifenóis e antocianinas. **Ciência Rural, Santa Maria**, v. 36, n. 4, p. 1283–1287, 2006.

LAGHA-BENAMROUCHEA, S.; MADANIA, K. Phenolic contents and antioxidant activity of orange varieties (*Citrus sinensis* L. and *Citrus aurantium* L.) cultivated in Algeria: Peels and leaves. **Industrial Crops and Products**, v. 50, p. 723–730, 2013.

LANDANIYA, M. S. **Citrus Fruit: Biology, Technology and Evaluation**. San Diego: Elsevier, 2008.

LAPIERRE, L.; UNDELAND, P.; COX, L. J. Lithium chloride-sodium propionate agar for the enumeration of bifidobacteria in fermented dairy products. **Journal of Dairy Science**, v. 75, p. 1192–1196, 1996.

LARRAURI, J. A. New approaches in the preparation of high dietary fibre powders from fruit by-products. **Trends in Food Science & Technology**, v. 10, p. 3–8, 1999.

- LARSEN, N.; VOGENSEN, F. K.; GOBEL, R. J.; MICHAELSEN, K. F.; FORSSTEN, S. D.; LAHTINEN, S. J.; JAKOBSEN, M. Effect of *Lactobacillus salivarius* Ls-33 on fecal microbiota in obese adolescents. **Clinical Nutrition**, v. 32, p. 945-950, 2013.
- LI, Q.; CHEN, J.; LI, T.; LIU, C.; WANG, X.; DAI, T.; MCCLEMENTS, D. J.; LIU, J. Impact of *in vitro* simulated digestion on the potential health benefits of proanthocyanidins from *Choerospondias axillaris* peels. **Food Research International**, 2015.
- LIMA, A. J. B.; CORRÊA, A. D.; DANTAS-BARROS, A. M.; NELSON, D. L.; AMORIM, A. C. L. Sugars, organic acids, minerals and lipids in jabuticaba. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 33, p. 540-550, 2011.
- LIMTRAKUL, P.; KHANTAMAT, O.; PINTHA, K. Inhibition of P-Glycoprotein Function and Expression by Kaempferol and Quercetin. **Journal of Chemotherapy**, v. 17, p. 86-95, 2005.
- LISERRE, A. M.; RÉ, M. I.; FRANCO, B. D. G. M. Microencapsulation of *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* in Modified Alginate-chitosan Beads and Evaluation of Survival in Simulated Gastrointestinal Conditions. **Journal of Food Biotechnology**, V. 21, 2007.
- LO-CURTO, A.; PITINO, I.; MANDALARI, G.; DAINITY, J. R.; FAULKS, R. M.; WICKHAM, M. S. J. Survival of probiotic lactobacilli in the upper gastrointestinal tract using an *in vitro* gastric model of digestion. **Food Microbiology**, v. 28, p. 1359-1366, 2011.
- LÓPEZ-NICOLÁS, R.; GONZÁLEZ-BERMÚDEZ, C. A.; ROS-BERRUEZO, G.; FRONTELA-SASETA, C. Influence of *in vitro* gastrointestinal digestion of fruit juices enriched with pine bark extract on intestinal microflora. **Food Chemistry**, v. 157, p. 14-19, 2014.
- LORENZI, H.; BACHER, L.; LACERDA, M.; SARTORI, S. Frutas brasileiras e exóticas cultivadas (de consumo *in natura*). **Instituto Plantarum de Estudos da Flora**, 2006.
- LU, Q.; JI, X.; ZHOU, Y.; YAO, X.; LIU, Y.; ZHANG, F.; YIN, X. Quercetin inhibits the mTORC1/p70S6K signaling-mediated renal tubular epithelial-mesenchymal transition and renal fibrosis in diabetic nephropathy. **Pharmacological Research**, v. 99, p. 237-247, 2015.
- LUCAS-GONZALEZ, R.; NAVARRO-COVES, S.; PÉREZ-ÁLVARZ, J. A.; FERNÁNDEZ-LÓPEZ, J.; MUÑOZ, L. A.; VIUDA-MARTOS, M. Assessment of polyphenolic profile stability and changes in the antioxidant potential of maqui berry (*Aristotelia chilensis* (Molina) Stuntz) during *in vitro* gastrointestinal digestion. **Industrial Crops and Products**, v. 94, p. 774-782, 2016.
- MA, J.; LI, Z.; XIE, W.; LIU, C.; LIU, S. Quercetin protects mouse liver against CCl₄-induced inflammation by the TLR2/4 and MAPK/NF-κB pathway. **International Immunopharmacology**, v. 28, p. 531-539, 2015.
- MADUREIRA, A. R.; AMORIM, M.; GOMES, A. M.; PINTADO, M. E.; MALCATA, F. X. Protective effect of whey cheese matrix on probiotic strains exposed to simulated gastrointestinal conditions. **Food Research International**, v. 44, p. 465-470, 2011.
- MANACH, C.; HUBERT, J.; LLORACH, R.; SCALBERT, A. The complex links between dietary phytochemicals and human health deciphered by metabolomics. **Molecular Nutrition & Food Research**, v. 53, p. 1303-1315, 2009.
- MAPA - MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO. Instrução Normativa n. 46, de 23 de outubro de 2007. Art. 1º - **Adota o Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade de Leites Fermentados**. Disponível em: <http://www.cidasc.sc.gov.br/inspecao/files/2012/08/INSTRUÇÃO-NORMATIVA-Nº-46-DE-23-DE-OUTUBRO-DE-2007.pdf>. Acesso em: 23 Set. 2015.
- MARÍN, F. R.; SOLER-RIVAS, C.; BENAVENTE-GARCÍA, O.; CASTILLO, J.; PÉREZ-ALVAREZ, J. A. By-products from different citrus processes as a source of customized functional fibres. **Food Chemistry**, v. 100, p. 736-741, 2007.

- MARTINI, S.; D'ADDARIO, C.; COLACEVICH, A.; FOCARDI, S.; BORGHINI, F.; SANTUCCI, A.; FIGURA, N.; ROSSI, C. Antimicrobial activity against *Helicobacter pylori* strains and antioxidant properties of blackberry leaves (*Rubus ulmifolius*) and isolated compounds. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 34, p. 50-59, 2009.
- MCANULTY, S. R.; MCANULTY, L. S.; NIEMAN, D. C.; QUINDRY, J. C.; HOSICK, P. A.; HUDSON, M. H.; STILL, L.; HENSON, D. A.; MILNE, G. L. MORROW, J. D.; DUMKE, C. L.; UTTER, A. C.; TRIPLETT, N. T.; DIBARNARDI, A. Chronic quercetin ingestion and exercise-induced oxidative damage and inflammation. **Applied Physiology Nutrition and Metabolism**, v. 33, p. 254-262, 2008.
- MEIRA, Q. G. S.; MAGNANI, M.; JÚNIOR, F. C. M.; QUEIROGA, R. C. R. E.; MADRUGA, M. S.; GULLÓNE, B.; GOMES, A. M. P.; PINTADO, M. M. E.; SOUZA, E. L. Effects of added *Lactobacillus acidophilus* and *Bifidobacterium lactis* probiotics on the quality characteristics of goat ricotta and their survival under simulated gastrointestinal conditions. **Food Research International**, v. 76, p. 828-838, 2015.
- MEZADRI, T.; VILLANO, D.; FERNANDEZ-PACHO, M. S.; GARCÍA-PARRILLA, M. C.; TRONCOSO, A. M. Antioxidant compounds and antioxidant activity in acerola (*Malpighia emarginata* DC.) fruits and derivatives. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 21, p. 282-290, 2008.
- MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2016. **Vigitel 2016 - Vigilância de Fatores de Risco e Proteção para Doenças Crônicas por Inquérito Telefônico**. Disponível em: http://portalarquivos.saude.gov.br/images/pdf/2017/abril/17/Vigitel_17-4-17-final.pdf. Acesso em: 04 jun. 2017.
- MINOLTA, K. **PRECISE COLOR COMMUNICATION: Color Control From perception to Instrumentation**. 2007. Disponível em: https://www.konicaminolta.com/instruments/knowledge/color/pdf/color_communication.pdf. Acesso em: jul. 2017.
- MOHAMMED, M. **Acerola (*Malpighia emarginata* DC.). Biologia e Tecnologia Pós-colheita de frutos tropicais e subtropicais**. Elsevier, p. 27-48, 2011.
- NEYRINCK, A. M.; ALLIGIER, B. M.; NÉVRAUMONT, E.; CANI, P. D.; DELZENNE, N. M. Impact d'un extrait de Curcuma longa associé au poivre blanc sur l'état inflammatoire chronique rencontré dans l'obésité: quelle relation avec le microbiote intestinal? **Diabetes & Metabolism**, v. 39, p. 26-29, 2013.
- NIU, L.; WU, J.; LIAO, X.; CHEN, F.; WANG, Z.; ZHAO, G.; HU, X. Physicochemical characteristics of orange juice samples from seven cultivars. **Agricultural Sciences in China**, v. 7 (1), p. 41-47, 2008.
- NÓBREGA, E. M.; OLIVEIRA, E. L.; GENOVESE, M. I.; CORREIA, R. T. P. The impact of hot air drying on the physical-chemical characteristics, bioactive compounds and antioxidant activity of acerola (*malpighia emarginata*) residue. **Journal of Food Processing and Preservation**, v. 39, p. 131-141, 2015.
- OBOH, G.; ADEMOSUN, A. O. Characterization of the antioxidant properties of phenolic extracts from some citrus peels. **Journal of Food Science and Technology**, v. 49 (6), p. 729-736, 2012.
- OLIVEIRA, A.; ALEXANDRE, E. M. C.; COELHO, M.; LOPES, C.; ALMEIDA, D. P. F.; PINTADO, M. Incorporation of strawberries preparation in yoghurt: Impact on phytochemicals and milk proteins. **Food Chemistry**, v. 171, p. 370-378, 2015.
- OLIVEIRA, A. C.; VALENTIM, I. B.; SILVA, C. A.; BECHARA, E. J. H.; BARROS, M. P.; MANO, C. M.; GOULART, M. O. F. Total phenolic content and free radical scavenging activities of methanolic extract powders of tropical fruit residues. **Food Chemistry**, v. 115, p. 469-475, 2009.

- OLIVEIRA, M. S.; CIPOLATTI, E. P.; FURLONG, E. B.; SOARES, L. S. Phenolic compounds and antioxidant activity in fermented rice (*Oryza sativa*) bran. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 32 (3), p. 531-537, 2012.
- O'SHEA, N.; ARENDT, E. K.; GALLAGHER, E. Dietary fibre and phytochemical characteristics of fruit and vegetable by-products and their recent applications as novel ingredients in food products. **Innovative Food Science and Emerging Technologies**, v. 16, p. 1-10, 2012.
- PADILHA, M.; MORALES, M. L. V.; VIEIRA, A. D. S. V.; COSTA, M. G. M.; SAAD, S. M. I. A prebiotic mixture improved *Lactobacillus acidophilus* and *Bifidobacterium animalis* gastrointestinal *in vitro* resistance in *petit-suisse*. **Food & Function**, v. 7, p. 2312–2319, 2016.
- PARKER, E. A.; ROY, T.; D'ADAMO, C. R.; WIELAND, L. S. Probiotics and Gastrointestinal Conditions: An Overview of Evidence from the Cochrane Collaboration. Nutrition, 2017. In press.
- PELUSO, I.; ROMANELLI, L.; PALMERY, M. Interactions between prebiotics, probiotics, polyunsaturated fatty acids and polyphenols: diet or supplementation for metabolic syndrome prevention? **International Journal of Food Sciences and Nutrition**, p. 1–9, 2014.
- PEREIRA, C. T. M. P.; SILVA, C. R. P.; LIMA, A.; PEREIRA, D. M.; COSTA, C. N.; NETO, A. A. C. Obtenção, caracterização físico-química e avaliação da capacidade antioxidante *in vitro* da farinha de resíduo de acerola (*Malpighia glabra* L.). **Acta Tecnológica**, v. 8 (2), 2013.
- PEREIRA, L. C.; SOUZA, C. H. B.; BEHRENS, J. H.; SAAD, S. M. I. *Lactobacillus acidophilus* and *Bifidobacterium* sp. in co-culture improve sensory acceptance of potentially probiotic *petit-suisse* cheese. **Acta Alimentaria**, v.39, (3), p. 265-276, 2010.
- PLAZA, L.; CRESPO, I.; PASCUAL-TERESA, S.; ANCOS, B.; SÁNCHEZ-MORENO, C.; MUÑOZ, M.; CANO, M. P. Impact of minimal processing on orange bioactive compounds during refrigerated storage. **Food Chemistry**, v. 124, p. 646–651, 2011.
- PORTER, L. J., HRSTICH, L. N., CHAN, B. G. The conversion of procyanidins and prodelphinidins to cyanidin and delphinidin. **Phytochemistry**, 25, 223-230, 1986.
- POSSEMIERS, S.; MARZORATI, M.; VERSTRAETE, W.; VAN DE WIELE, T. Bacteria and chocolate: A successful combination for probiotic delivery. **International Journal of Food Microbiology**, v. 141, p. 97–103, 2010.
- PRIOR, R. L.; HOANG, H.; GU, L.; WU, X.; BACCHIOCCA, M.; HOWARD, L.; HAMPSCH-WOODILL, M.; HUANG, D.; OU, B.; JACOB, R. Assays for Hydrophilic and Lipophilic Antioxidant Capacity (oxygen radical absorbance capacity (ORACFL)) of Plasma and Other Biological and Food Samples. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Vol. 51, No. 11, 2003.
- PRISCILLA, D. H.; JAYAKUMAR, M.; THIRUMURUGAN, K. Flavanone naringenin: An effective antihyperglycemic and antihyperlipidemic nutraceutical agent on high fat diet fed streptozotocin induced type 2 diabetic rats. **Journal of Functional Foods**, v. 14, p. 363-373, 2015.
- PRISCILLA, D. H.; ROY, D.; SURESH, A.; KUMAR, V.; THIRUMURUGAN, K. Naringenin inhibits α -glucosidase activity: A promising strategy for the regulation of postprandial hyperglycemia in high fat diet fed streptozotocin induced diabetic rats. **Chemico-Biological Interactions**, v. 210, p. 77–85, 2014.
- RANADHEERA, C. S.; EVANS, C. A.; ADAMS, M. C.; BAINES, S. K. *In vitro* analysis of gastrointestinal tolerance and intestinal cell adhesion of probiotics in goat's milk ice cream and yogurt. **Food Research International**, v. 49, p. 619–625, 2012.
- RICHTER, E. P.; VEDAMUTHU, E. R. **Milk and milk products**. In: DOWNES, F.P.; ITO, K., eds. **Compendium of methods for the microbiological examination of foods**. 4^a ed. Washington: APHA, p. 483-495, 2001.

- RIGHETTO, A. M.; NETTO, F. M.; CARRARO, F. Chemical Composition and Antioxidant Activity of Juices from Mature and Immature Acerola (*Malpighia emarginata* DC). **Food Science and Technology International**, v. 11 (4), p. 315–321, 2005.
- RITZINGER, R.; RITZINGER, C. H. S. P. Acerola. **Informe Agropecuário, Belo Horizonte**, v. 32, n. 264, p. 17-25, 2011. Disponível em: <http://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/item/54086/1/Acerola-RITZINGER-Rogério.pdf>. Acesso em 15 jun. 2014.
- ROBERFROID, M.; GIBSON, G. R.; HOYLES, L.; MCCARTNEY, A. L.; RASTALL, R.; ROWLAND, I. et al. Prebiotic effects: metabolic and health benefits. **British Journal of Nutrition**, v. 104, p. S1–S63, 2010.
- RUFINO, M. S. M.; ALVES, R. E.; BRITO, E. S.; PÉREZ-GIMÉNEZ, J.; SAURA-CALIXTO, F.; MANCINI-FILHO, J. Bioactive compounds and antioxidant capacities of 18 non-traditional tropical fruits from Brazil. **Food Chemistry**, v. 121, p. 996-1002, 2010.
- RUPRICHOVÁ, L.; DRACKOVÁ, M.; BORKOVCOVÁ, I.; VORLOVÁ, L. Determination of proteins in yoghurt. **Journal of Microbiology, Biotechnology and Food Sciences**, v. 1 (4), p. 644-650, 2012.
- SAAD, S. M. I. Probióticos e prebióticos: o estado da arte. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**. v. 42 (1), p. 1-16, 2006.
- SAAD, S. M. I.; CRUZ, A. G.; FARIA, J. A. F. **Probióticos e prebióticos em alimentos: Fundamentos e aplicações tecnológicas**. São Paulo: Livraria Varela, p. 51-84, 2011.
- SAH, B.N.P; VASILJEVIC, T; MCKECHNIE, S.; DONKOR, O. N. Physicochemical, textural and rheological properties of probiotic yogurt fortified with fibre-rich pineapple peel powder during refrigerated storage. **Food Science and Technology**, v. 65, p. 978-986, 2016.
- SAKANASHI, Y.; OYAMA, K.; MATSUI, H.; OYAMA, T. B.; OYAMA, T. M.; NISHIMURA, Y.; SAKAI, H.; OYAMA, Y. Possible use of quercetin, an antioxidant, for protection of cells suffering from overload of intracellular Ca²⁺: A model experiment. **Life Sciences**, v. 83, p. 164–169, 2008.
- SANCHO, L. E. G.; YAHIA, E. M.; GONZÁLEZ-AGUILAR, G. A. Identification and quantification of phenols, carotenoids, and vitamin C from papaya (*Carica papaya* L., cv. Maradol) fruit determined by HPLC-DAD-MS/MS-ESI. **Food Research International**, v. 44, p. 1284–1291, 2011.
- SAWALHA, S. M. S.; ARRÁEZ-ROMÁN, D.; SEGURA-CARRETERO, A.; FERNÁNDEZ-GUTIÉRREZ, A. Quantification of main phenolic compounds in sweet and bitter orange peel using CE–MS/MS. **Food Chemistry**, v. 116, p. 567–574, 2009.
- SCALBERT, A.; ANDRES-LACUEVA, C.; ARITA, M.; KROON, P.; MANACH, C.; URPI-SARDA, M.; WISHART, D. Databases on Food Phytochemicals and Their Health-Promoting Effects. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 59, p. 4331–4348, 2011.
- SEAB/DERAL – SECRETARIA DE ESTADO DA AGRICULTURA E DO ABASTECIMENTO / DEPARTAMENTO DE ECONOMIA RURAL, 2015. **Fruticultura, maio de 2015**. Disponível em: http://www.agricultura.pr.gov.br/arquivos/File/deral/Prognosticos/fruticultura_2014_15.pdf. Acesso em 13 set. 2015.
- SELMA, M. V., ESPIN, J. C.; TOMAS-BARBERAN, F. A. Interaction between phenolics and gut microbiota: role in human health. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 57, p. 6485-6501, 2009.
- SENDRA, E.; FAYOS, P.; LARIO, Y.; FERNÁNDEZ-LÓPEZ, J.; SAYAS-BARBERÁ, E.; PÉREZ-ALVAREZ, J. A. Incorporation of citrus fibers in fermented milk containing probiotic bacteria. **Food Microbiology**, v. 25, p. 13–21, 2008.

- SENGUL, H.; SUREK, E.; NILUFER-ERDIL, D. 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**, v. 62, p. 1069–1079, 2014.
- SHEN, Q.; ZHAO, L.; TUOHY, K. M. High-level dietary fibre up-regulates colonic fermentation and relative abundance of saccharolytic bacteria within the human faecal microbiota *in vitro*. **European Journal of Nutrition**, v. 51, p. 693–705, 2012.
- SILVA, L. M. R.; FIGUEIREDO, E. A. T.; RICARDO, N. M. P. S.; VIEIRA, I. G. P.; FIGUEIREDO, R. W.; BRASIL, I. M.; GOMES, C. L. Quantification of bioactive compounds in pulps and by-products of tropical fruits from Brazil. **Food Chemistry**, v. 143, p. 398–404, 2014.
- SINGLETON, V. L.; ORTHOFER, R.; LAMUELA-RAVENTOS, R. M. Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of Folin-Ciocalteu reagent. **Methods in Enzymology**, v. 229, p. 152–178, 1999.
- SKINNER, M.; HUNTER, D. **Bioactives in Fruit. Health Benefits and Functional Foods**. John Wiley & Sons, 2013.
- SOUSA, M. S. B.; VIEIRA, L. M.; SILVA, M. J. M., LIMA, A. Caracterização nutricional e compostos antioxidantes em resíduos de polpas de frutas tropicais. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 35, n. 3, p. 554–559, 2011.
- SOUZA, M. W. S.; FERREIRA, T. B. O.; VIEIRA, I. F. R. Composição centesimal e propriedades funcionais tecnológicas da farinha da casca do maracujá. **Alimentos e Nutrição Araraquara**, v. 19(1), p. 33–36, 2008.
- SUCCI, M.; TREMONTE, P.; PANNELLA, G.; TIPALDI, L.; COZOLLINO, A.; COPPOLA, R.; SORRENTINO, E. Survival of commercial probiotic strains in dark chocolate with high cocoa and phenols content during the storage and in a static *in vitro* digestion model. **Journal of Functional Foods**, v. 35, p. 60–67, 2017.
- SURIANO, S.; ALBA, V.; TARRICONE, L.; GENNARO, D. Maceration with stems contact fermentation: Effect on proanthocyanidins compounds and color in Primitivo red wines. **Food Chemistry**, v. 177, p. 382–389, 2015.
- TACO – **Tabela Brasileira de Composição de Alimentos**. Campinas, 2011. Disponível em: <http://www.unicamp.br/nepa/taco/tabela.php?ativo=tabela>. Acesso em: 23 set. 2015.
- TAGLIAZUCCHI, D.; VERZELLONI, E.; BERTOLINI, D.; CONTE, A. *In vitro* bioaccessibility and antioxidant activity of grape polyphenols. **Food Chemistry**, v. 120, p. 599–606, 2010.
- TENORE, G. C.; CAMPIGLIA, P.; RITIENI, A.; NOVELLINO, E. *In vitro* bioaccessibility, bioavailability and plasma protein interaction of polyphenols from Annurca apple (*M. pumila* Miller cv Annurca). **Food Chemistry**, v. 141, p. 3519–3524, 2013.
- VIEIRA, A. D. S.; BEDANI, R.; ALBUQUERQUE, M.A.C.; BISCOLA, V.; SAAD, S. M. I. The impact of fruit and soybean by-products and amaranth on the growth of probiotic and starter microorganisms. **Food Research International**, v. 97, p. 356–363, 2017.
- VILLARREAL, M. L. M.; PADILHA, M.; VIEIRA, A. D. S.; FRANCO, B. D. G. M.; MARTINEZ, R. C. R.; SAAD, S. M. I. Advantageous Direct Quantification of Viable Closely Related Probiotics in *Petit-Suisse* Cheeses under *In Vitro* Gastrointestinal Conditions by Propidium Monoazide – qPCR. **Plos One**, v. 8 (12), 2013.
- VITALI, B.; NDAGIJIMANA, M.; CRUCIANI, F.; CARNEVALI, P.; CANDELA, M.; GUERZONI, M.E.; BRIGIDI, P. Impact of a synbiotic food on the gut microbial ecology and metabolic profiles. **BMC Microbiology**, v. 10 (4), 2010.

- VIUDA-MARTOS, M.; FERNANDEZ-LOPEZ, J.; SAYAS-BARBERA, E.; SENDRA, E.; PEREZ-ALVAREZ, J. A. Physicochemical Characterization of the orange juice waste water of a citrus by-product. **Journal of Food Processing**, v. 35, p. 264-271, 2011.
- WANG, W.; SUN, C.; MAO, L.; MA, P.; LIU, F.; YANG, J.; GAO, Y. The biological activities, chemical stability, metabolism and delivery systems of quercetin: A review. **Trends in Food Science & Technology**, v. 56, p. 21-38, 2016.
- WANG, Y.; CHUANG, Y.; HSU, H. The flavonoid, carotenoid and pectin content in peels of citrus cultivated in Taiwan. **Food Chemistry**, v. 106, p. 277-284, 2008.
- WANG, Y.; CHUNG, S.; SONG, W.; CHUN, O. K. Estimation of Daily Proanthocyanidin Intake and Major Food Sources in the U.S. Diet. **The Journal of Nutrition**, v. 141, p. 447-452, 2011.
- WICHIENTHOT, S.; JATUPORNPIPAT, M.; RASTALL, R. A. Oligosaccharides of pitaya (dragon fruit) flesh and their prebiotic properties. **Food Chemistry**, v. 120, p. 850-857, 2010.
- WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2014. **Global status report on noncommunicable diseases 2014**. Disponível em: <http://www.who.int/nmh/publications/ncd-status-report-2014/en/>. Acesso em: jun. 2017.
- WU, X.; BEECHER, G. R.; HOLDEN, J. M.; HAYTOWITZ, D. B.; GEBHARDT, S. E.; PRIOR, R. L. Concentrations of Anthocyanins in Common Foods in the United States and Estimation of Normal Consumption. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 54, p. 4069-4075, 2006.
- YAMANAKA, H. T. **Sucos cítricos**. CETESB – COMPANHIA DE TECNOLOGIA DE SANEAMENTO AMBIENTAL, 2005. Disponível em: http://www.crq4.org.br/downloads/sucos_citricos.pdf. Acesso em 04 mar. 2014.
- YAO, W. R.; WANG, H. Y.; WANG, S. T.; SUN, S. L.; ZHOU, J.; LUAN, Y. Y. Assessment of the Antibacterial Activity and the Antidiarrheal Function of Flavonoids from Bayberry Fruit. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 59 (10), p. 5312-5317, 2011.
- ZHANG, S.; CUI, Y.; LI, L.; LI, Y.; ZHOU, P.; LUO, L.; SUN, B. Preparative HSCCC isolation of phloroglucinolysis products from grape seed polymeric proanthocyanidins as new powerful antioxidants. **Food Chemistry**, v. 188, p. 422-429, 2015.
- ZHANG, Y.; SUN, Y.; XI, W.; SHEN, Y.; QIAO, L.; ZHONG, L.; YE, X.; ZHOU, Z. Phenolic compositions and antioxidant capacities of Chinese wild mandarin (*Citrus reticulata* Blanco) fruits. **Food Chemistry**, v. 145, p. 674-680, 2014.