

UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA NUTRIÇÃO

SABRINA DUARTE DE OLIVEIRA

**AVALIAÇÃO DE COMPOSTOS BIOATIVOS DE COPRODU-
TOS DO PROCESSAMENTO DE ACEROLA E GOIABA
FERMENTADOS COM ISOLADOS DE *Lactobacillus* POTEN-
CIALMENTE PROBIÓTICOS**

JOÃO PESSOA
2020

SABRINA DUARTE DE OLIVEIRA

**AVALIAÇÃO DE COMPOSTOS BIOATIVOS DE COPRODUTOS DO
PROCESSAMENTO DE ACEROLA E GOIABA FERMENTADOS COM
ISOLADOS DE *Lactobacillus* POTENCIALMENTE PROBIÓTICOS**

**JOÃO PESSOA
2020**

SABRINA DUARTE DE OLIVEIRA

AVALIAÇÃO DE COMPOSTOS BIOATIVOS DE COPRODUTOS DO PROCESSAMENTO DE ACEROLA E GOIABA FERMENTADOS COM ISOLADOS DE *Lactobacillus* POTENCIALMENTE PROBIÓTICOS.

Dissertação de mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Nutrição, do Centro de Ciências da Saúde, da Universidade Federal da Paraíba, como pré-requisito para obtenção do título de Mestre em Ciências da Nutrição.

Área de concentração: Ciências da Nutrição.
Linha de Pesquisa: Análise e Controle de Qualidade em Alimentos.

ORIENTADORA: Prof.^a Dr.^a Maria Elieidy Gomes de Oliveira

JOÃO PESSOA
2020

Catálogo na publicação
Seção de Catalogação e Classificação

O48a Oliveira, Sabrina Duarte de.
Avaliação de compostos bioativos de coprodutos do processamento de acerola e goiaba fermentados com isolados de *Lactobacillus* potencialmente probióticos / Sabrina Duarte de Oliveira. - João Pessoa, 2020.
70 f.

Orientação: Maria Elieidy Gomes Oliveira.
Dissertação (Mestrado) - UFPB/CCS.

1. Resíduos agroindustriais. 2. Bactérias ácido lácticas. 3. Fermentação submersa. 4. Bioatividade. 5. Antioxidantes. I. Oliveira, Maria Elieidy Gomes. II. Título.

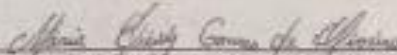
UFPB/BC

SABRINA DUARTE DE OLIVEIRA

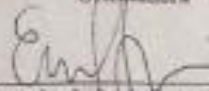
AVALIAÇÃO DE COMPOSTOS BIOATIVOS DE COPRODUTOS DO
PROCESSAMENTO DE ACEROLA E GOLABA FERMENTADOS COM
ISOLADOS DE *Lactobacillus* POTENCIALMENTE PROBIÓTICOS

Dissertação Aprovada em 07/04/2020.

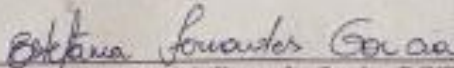
BANCA EXAMINADORA



Profa. Dra. Maria Eliesty Gomes de Oliveira - DN/CCS/UFPB
Coordenadora da Banca Examinadora
Orcid iD



Prof. Dr. Evandro Leles de Souza - DN/CCS/UFPB
Examinador Interno



Profa. Dra. Estefania Fernandes Garcia - DG/CTDR/UFPB
Examinadora Externa

Profa. Dra. Rita de Cássia Ramos do Egypto Queiroz - DN/CCS/UFPB
Examinadora Suplente Interna

Profa. Dra. Vanessa Bordin Vieira - UAS/CCS/UPCG
Examinadora Suplente Externa

*Aos meus pais, Risoneide e José, e a minha irmã,
Gabriela, por todo amor incondicional que me
mantêm firme nos melhores e piores dias.*

Dedico.

AGRADECIMENTOS

A Deus, por ser o sustento da minha vida, por iluminar e guiar os meus passos na direção dos melhores caminhos e por me dar esperança de dias melhores.

Aos meus pais, Risoneide Duarte de Oliveira e José Benevenuto de Oliveira Neto, por acreditarem nos meus sonhos, por todo esforço que fizeram para me ajudar a concluir cada etapa da minha vida, sem vocês nada disso seria possível.

A minha irmã e melhor amiga, Gabriela Durate, por vibrar comigo todas as minhas conquistas e por acreditar em mim, você é a razão pela qual todos os dias eu arrumo forças para não desistir dos nossos objetivos.

Ao meu namorado e melhor amigo, José Henrique, quando eu achei que não era mais capaz, você me fez enxergar a minha força, obrigada por acreditar em mim quando nem eu mais acreditava.

A minha orientadora, Maria Elieidy, por ser minha inspiração, por ser exemplo de humildade, inteligência e amor, por toda dedicação e paciência durante a construção desse trabalho, sem você eu não teria chegado até aqui.

Ao professor Dr. Evandro Leite de Souza, por ter aberto as portas do Laboratório de Bioquímica e Microbiologia de Alimentos para realização deste trabalho, por toda disponibilidade, que vai além da estrutura física e material, mas de atenção e cuidado com todas as considerações para a melhoria deste trabalho e escrita do artigo científico.

À professora Dra. Maria Lúcia da Conceição, pelo acolhimento e alegria que tornavam os dias mais iluminados, pelo carinho e toda disponibilidade a mim conferida.

À professora Dra. Estefânia Fernandes Garcia, por toda sua disponibilidade e atenção, e também pelas suas relevantes considerações para a melhoria do meu trabalho.

Ao professor Dr. Marcos dos Santos Lima, do Instituto Federal do Sertão de Pernambuco em Petrolina-PE, pela condução das análises cromatográficas.

À professora da UFCG/Cuité-PB, Dra. Vanessa Bordin Vieira, por toda atenção e apoio nas análises de carotenoides totais, compostos fenólicos totais, flavonoides totais e atividade antioxidante dos coprodutos de frutas e fermentados.

À coordenadora do Laboratório de Bromatologia/UFPB, professora Dra. Rita de Cássia, por gentilmente ceder o espaço físico e insumos utilizados para realização das análises físico-químicas dos coprodutos.

À professora Dra. Graciele Borges, do Centro de Tecnologia e Desenvolvimento Regional/UFPB, pela disponibilidade e apoio na realização das análises de vitamina C.

A minha querida amiga, Caroliny Mesquita, por me auxiliar no laboratório, por todo apoio e companheirismo.

Às técnicas do Laboratório de Bioquímica e Microbiologia de Alimentos/UFPB, Sônia e Heloísa, e aos técnicos do Laboratório de Bromatologia/UFPB, Guilherme e Eduardo, por toda disponibilidade e gentileza em me ajudar durante as análises e atenção ao responder as minhas dúvidas.

À Ana Cristina, Mateus Vasconcelos e Davi Nascimento, pela amizade e por todo apoio durante a realização das análises do meu trabalho.

A minha amiga, Louise Iara, por dividir comigo não só o mestrado, mas o lar, por todo companheirismo, por ser exemplo de força e determinação, você é uma das mulheres que me inspira.

As minhas amigas, Jéssica Rodrigues e Maria Elzany, por estarem sempre comigo, apesar da distância física.

Aos meus padrinhos de batismo, Geraldo Cirilo e Francisca Ismael, por todo amor e ensinamentos durante toda a minha vida.

Ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Nutrição/UFPB, em especial ao corpo docente, pela oportunidade e atenção no decorrer do curso de mestrado.

Ao secretário da Pós-Graduação, Carlos Fernando, que sempre foi muito solícito em atender aos meus pedidos e responder as minhas dúvidas.

A CAPES pelo apoio financeiro e concessão da bolsa (Código financeiro 001)

A todas as pessoas que de forma direta ou indireta foram essenciais no desenvolvimento e conclusão desse trabalho, meu muito obrigada!

*“Grandes palavras são necessárias
para expressar grandes idéias”.*

Anne With in E

RESUMO

O Brasil é o terceiro maior produtor de frutas no mundo e grande parte dessa produção é destinada a indústria do processamento de alimentos, gerando expressiva quantidade de coprodutos agroindustriais, que são geralmente descartados. Esses coprodutos são naturalmente fonte de compostos bioativos e existem mecanismos que podem estimular a produção destes compostos nessa matriz, como é o caso da fermentação por microrganismos pré-selecionados, como as bactérias ácido lácticas (BAL). Desta forma, o objetivo deste estudo foi de realizar a fermentação inoculada (*Lactobacillus plantarum* 53, *L. paracasei* 106, *L. casei* L-26 e *L. fermentum* 56, em co-cultura na proporção de 1:1:1:1) de coprodutos do processamento de acerola (*Malpighia emarginata* D.C., ACE) e goiaba (*Psidium guajava* L., GOI) a uma temperatura de 37 °C, a 200 rpm, por 120 horas, avaliando alterações no perfil de compostos bioativos durante a fermentação. Antes da fermentação, realizaram-se análises da caracterização físico-química dos coprodutos de acerola e goiaba. Nos intervalos de zero, 8, 24, 48, 72 e 120 horas de fermentação foi realizada a contagem de células viáveis de *Lactobacillus* probióticos. Os parâmetros físico-químicos, conteúdo de compostos bioativos (perfil de fenólicos e fenólicos totais, carotenóides totais, flavonóides e vitamina C) e atividade antioxidante (FRAP e ABTS) foram avaliados nos tempos zero, 48, 72 e 120 horas de fermentação. No tempo zero da fermentação, a contagem de células viáveis de *Lactobacillus* probióticos em ACE e GOI foi superior a 8,5 log de UFC/mL e após 120 horas de fermentação caiu ($p \leq 0,05$) para valores $\geq 5,5$ log de UFC/mL. Quanto aos parâmetros de colorimetria, houve aumento da luminosidade e redução do contraste ao longo da fermentação e os coprodutos fermentados apresentaram uma tonalidade tendendo a ir do vermelho para vermelho-amarelado durante este período ($p \leq 0,05$). Houve diminuição no conteúdo de sólidos solúveis totais durante a fermentação, com concomitante aumento da acidez titulável e redução do pH, para ambos os coprodutos fermentados ($p \leq 0,05$). O conteúdo de ácido ascórbico diminuiu para ACE e aumentou para GOI durante a fermentação ($p \leq 0,05$). Diferentes compostos fenólicos foram encontrados em ACE e GOI durante a fermentação. O conteúdo de flavonóides e fenólicos totais nos coprodutos fermentados aumentou ao longo da fermentação e possivelmente favoreceu a maior atividade antioxidante observada, principalmente para ACE ($p \leq 0,05$), o que foi confirmado com a Análise de Componentes Principais, que mostrou uma forte correlação desses compostos com a atividade antioxidante observada nos ensaios FRAP e ABTS. Os resultados obtidos nesse estudo indicam que a fermentação de coprodutos de ACE e GOI, quando inoculados com cepas de *Lactobacillus* em co-cultura (*L. plantarum* 53, *L. paracasei* 106, *L. casei* L-26 e *L. fermentum* 56), pode ser uma estratégia para melhorar seu conteúdo de compostos bioativos e atividade antioxidante, e, conseqüentemente, potenciais propriedades realizadas à saúde.

Palavras-chave: Resíduos agroindustriais. Bactérias ácido lácticas. Fermentação submersa. Bioatividade. Antioxidantes.

ABSTRACT

Brazil is the third-largest fruit producer in the world and a large part of this production is destined to the food processing industry, generating a expressive amount of agro-industrial coproducts, which are generally discarded. These coproducts are naturally sources of bioactive compounds, in addition, some mechanisms can stimulate the production of these compounds in this matrix, as is the case of fermentation by pre-selected microorganisms, such as lactic acid bacteria (LAB). Thus, the objective of this study was to carry out the inoculated fermentation (*Lactobacillus plantarum* 53, *L. paracasei* 106, *L. casei* L-26, and *L. fermentum* 56, in co-culture in a ratio of 1:1:1:1) of acerola coproducts (*Malpighia emarginata* D.C., ACE) and guava (*Psidium guajava* L., GUA) at a temperature of 37 °C, at 200 rpm, for 120 hours, evaluating the change in the profile of bioactive compounds during fermentation. Before fermentation, analyzes of physical-chemical characterization of the coproducts of acerola and guava were realized. In the intervals of zero, 8, 24, 48, 72 and 120 hours of fermentation viable cell count of probiotic *Lactobacillus* was performed. Physical-chemical parameters, the contents of bioactive compounds (phenolic and total phenolic profiles, total carotenoids, flavonoids and vitamin C) and antioxidant activity (FRAP and ABTS) were evaluated at zero, 48, 72 and 120 hours of fermentation. At zero fermentation time, the viable cell count of probiotic *Lactobacillus* for ACE and GUA was greater than 8.5 log CFU mL⁻¹ and after 120 hours of fermentation it fell ($p \leq 0.05$) to values ≥ 5.0 log CFU/ml. As for the colorimetry parameters, there was an increase in luminosity and a reduction in contrast throughout the fermentation, and the fermented coproducts tended to go from red to yellow-red during this period ($p \leq 0.05$). There was a decrease in the content of total soluble solids during fermentation, with a concomitant increase in titratable acidity and lactic acid content, and reduction in pH, for both fermented coproducts ($p \leq 0.05$). The ascorbic acid content decreased for ACE and increased for GUA during fermentation ($p \leq 0.05$). Different phenolic compounds were found in ACE and GUA during fermentation. The content of flavonoids and total phenolics in the fermented by-products increased during the fermentation and possibly favored the greater antioxidant activity observed, mainly for ACE ($p \leq 0.05$), this was confirmed in the Principal Component Analysis, which showed a strong correlation of these compounds with the activity antioxidant observed in the FRAP and ABTS assays. The results obtained in this study indicate that the fermentation of ACE and GUA coproducts, when inoculated with strains of *Lactobacillus* in co-culture (*L. plantarum* 53, *L. paracasei* 106, *L. casei* L-26 and *L. fermentum* 56), it can be a strategy to improve its contents of bioactive compounds and antioxidant activities, and, consequently, potential health properties.

Keywords: Agro-industrial waste. Lactic Acid Bacteria. Submerged fermentation. Bioactivity. Antioxidants.

LISTA DE TABELAS

TABELAS DO ARTIGO

Table 1 - Physicochemical and colour parameters and contents of different bioactive compounds (mean \pm standard deviation) of acerola (ACE) and guava coproduct (GUA) used in fermentation.....	69
Table 2 - Values of color parameters and contents of bioactive compounds in acerola (ACE) and guava coproducts (GUA) during fermentation with potentially probiotic <i>Lactobacillus</i> for 120 h.....	70
Table 3 - Phenolic compounds (mean \pm standard deviation) identified in acerola (ACE) and guava coproduct (GUA) during a 120 h-fermentation with potentially probiotic <i>Lactobacillus</i>	71

LISTA DE QUADROS

QUADROS DA DISSERTAÇÃO

Quadro 1 - Alimentos não lácteos fermentados por BAL.....	26
--	----

LISTA DE FIGURAS

FIGURAS DA DISSERTAÇÃO

Figura 1 - Acerola (<i>Malpighia emarginata</i> D.C.).....	20
Figura 2 - Goiaba (<i>Psidium guajava</i> L.).....	22
Figura 3 - Delineamento experimental do estudo.....	29
Figura 4 - Coprodutos do processamento de acerola (a) e goiaba (b), antes da fermentação	30
Figura 5 - Coprodutos de acerola (a) e goiaba (b) no tempo 0 da fermentação.....	31

FIGURAS DO ARTIGO

Figure 1 - Viable counts (log CFU/mL) of potentially probiotic <i>Lactobacillus</i> in acerola (ACE, ■) and guava coproduct (GUA, ▲) during the 120 h-fermentation.....	66
Figure 2 - Values of total soluble solids (a), titratable acidity (b) and pH (c) in acerola (ACE, ■) and guava coproduct (GUA, ▲) during a 120 h-fermentation with potentially probiotic <i>Lactobacillus</i>	67
Figure 3 - Principal component analysis (PCA) of the viable counts of potentially probiotic <i>Lactobacillus</i> , contents of ascorbic acid, total carotenoids, total flavonoids, total phenolics and antioxidant activity (FRAP and ABTS) of fermented acerola and guava coproducts at zero, 48, 72 and 120 h. A: acerola coproduct fermented with probiotic <i>Lactobacillus</i> ; G: guava coproduct fermented with probiotic <i>Lactobacillus</i>	68

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ABTS	Capacidade Antioxidante Equivalente a Trolox
ACE	Fermentação Inoculada de Acerola
ACP	Análise de Componentes Principais
AT	Acidez Titulável
BAL	Bactérias Ácido Láticas
BEM	Eosin Methylene Blue
BS	Bismuth Sulfito
C	Croma
CCS	Centro de Ciências da Saúde
CES	Centro de Educação e Saúde
CLAE	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
DAD	Detector de Arranjos de Diodos
DCNT	Doença Crônica Não Transmissível
EAG	Equivalentes de Ácido Gálico
EC	Equivalentes de Catequina
FRAP	Capacidade Redutora de Ferro
GOI	Fermentação Inoculada de Goiaba
LABROM	Laboratório de Bromatologia de Alimentos
LB	Laboratório de Bromatologia
LEA	Laboratório Experimental de Alimentos
LMBA	Laboratório de Microbiologia e Bioquímica de Alimentos
LPA	Laboratório de Processamento de Alimentos
MRS	Man, Rogosa e Sharpe
NMP	Número Mais Provável
PCA	Plate Count Agar
SST	Sólidos Solúveis Totais
UAS	Unidade Acadêmica de Saúde
UFC	Unidades Formadora de Colônia
UFPB	Universidade Federal da Paraíba
UV	Ultravioleta

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	17
2 REFERENCIAL TEÓRICO	19
2.1 FRUTAS E COPRODUTOS DO PROCESSAMENTO DE FRUTAS	19
2.1.1 Acerola (<i>Malpighia emarginata</i> D.C.).....	20
2.1.2 Goiaba (<i>Psidium guajava</i> L.).....	21
2.2 COMPOSTOS BIOATIVOS EM FRUTAS E COPRODUTOS DE FRUTAS	22
2.3 EFEITOS DA FERMENTAÇÃO POR BAL NO CONTEÚDO DE COMPOSTOS BI-OATIVOS.....	24
3 MATERIAL E MÉTODOS	28
3.1 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL.....	28
3.2 OBTENÇÃO E PREPARAÇÃO DOS COPRODUTOS DE FRUTAS.....	28
3.3 MICRORGANISMOS E PREPARAÇÃO DO INÓCULO.....	30
3.4 FERMENTAÇÃO DOS COPRODUTOS DE ACEROLA E GOIABA.....	31
3.4.1 Contagem de células viáveis de <i>Lactobacillus</i> probióticos durante a fermentação de ACE e GOI.....	31
3.5 CARACTERIZAÇÃO E AVALIAÇÃO DOS COMPOSTOS BIOATIVOS E DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DOS COPRODUTOS ANTES E DURANTE A FERMENTAÇÃO.....	32
3.5.1 Determinação das características físico-químicas.....	32
3.5.2 Determinação do conteúdo de ácido ascórbico e carotenoides totais.....	33
3.5.3 Determinação do conteúdo total de fenólicos e flavonóides.....	33
3.5.4 Determinação do perfil dos compostos fenólicos.....	34
3.5.5 Atividade Antioxidante.....	35
3.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	36
4 RESULTADOS	37
REFERÊNCIAS	38
APÊNDICES	46

1 INTRODUÇÃO

O Brasil é o terceiro maior produtor de frutas do mundo, depois da China e da Índia, com plantações que englobam mais de 2 milhões de hectares e produção que alcança mais de 40 milhões de toneladas de frutas por ano (TRIECHEL, 2017; FORSTER-CARNEIRO et al., 2013).

Entre as principais frutas produzidas no Brasil, se destacam a acerola (*Malpighia emarginata* D.C.) e a goiaba (*Psidium guajava* L.), frutas tropicais que podem ser utilizadas para produção de suco, geleia, sorvete, doces e outros. São frutas amplamente conhecidas por seu alto valor nutricional, uma vez que são ricas em compostos bioativos e seu consumo está associado à efeitos saudáveis relevantes, uma vez que atuam na promoção de saúde (ALVA-REZ-SUAREZ et al., 2018; JAESCHKE; MARCZAK; MERCALI, 2016; PAZ et al., 2015).

A utilização destas frutas para elaboração de polpas, doces, geleias, sorvetes e outros, resulta numa larga escala de geração de coprodutos (partes não utilizadas no processamento da indústria, como casca, sementes, bagaços e talos). Os coprodutos oriundos do processamento de frutas, também denominados resíduos e subprodutos, são ricos em compostos bioativos e contém uma parcela substancialmente maior de substâncias bioativas em comparação, algumas vezes, com a polpa desta mesma fruta (BORTOLOTTI et al., 2013; MICHALSKA; LYSIAK, 2014).

Dentre os compostos bioativos presentes em frutas e em seus coprodutos, destacam-se os compostos fenólicos, vitaminas e carotenoides (CLERICI; CARVALHO-SILVA, 2011), por possuir elevada atividade antioxidante, o que está positivamente associada à promoção de saúde. Os compostos atuam na proteção contra o estresse oxidativo no organismo, exercendo papel fundamental na etiologia de várias doenças crônicas não transmissíveis (DCNT), como doenças cardiovasculares, diabetes, câncer, doenças autoimunes, distúrbios neurodegenerativos, obesidade, entre outros (IANNITTI; PALMIER, 2009; LEITE et al., 2011; POPKIN, 2015; SIRIWARDHANA et al., 2013). Embora a valiosa composição natural dos coprodutos de frutas já reconhecida, existem mecanismos que podem aumentar ainda mais a produção de compostos bioativos nessas matrizes, entre elas a fermentação (GOBBETTI; DI CAGNO; DE ANGELIS, 2010; CAMPANELLA et al, 2017).

A fermentação de produtos de origem vegetal consiste em um método tradicional de conservação desta matriz, que além de aumentar a vida de prateleira, proporciona melhor aceitabilidade e agregação de valor nutricional e funcional, em consequência do aumento de

compostos bioativos promotores de efeitos benéficos para a saúde do consumidor (LIMON et al., 2015).

O processo de fermentação pode acontecer através da inoculação por microrganismos pré-selecionados, entre eles, as bactérias ácido lácticas (BAL), isoladas ou não de frutas e hortaliças, ou ainda pela adição de cepas comerciais, e caracteriza-se por ser um processo controlado (tempo, temperatura, umidade, pH, composição atmosférica e atividade de água), que permite o aumento da população das bactérias presentes, com concomitante fermentação. A quebra estrutural induzida por fermentação das paredes celulares de frutas e coprodutos pode liberar e/ou induzir a síntese de vários compostos bioativos. Além disso, a fermentação pode inibir o crescimento de microrganismos patogênicos e deteriorantes, bem como modificar características de sabor, odor e textura (DI CAGNO et al., 2013; KIM; KIM; KANG, 2019).

Por serem presuntivamente conhecidas como seguras e desempenharem papel probiótico, algumas linhagens de *Lactobacillus*, entre elas, *Lactobacillus plantarum* 53, *L. paracasei* 106, *L. casei* L-26 e *L. fermentum* 56, resultaram na maior conscientização sobre o desenvolvimento de novos alimentos fermentados usando essas espécies (ARGYRI et al., 2013; SUN et al., 2015). Além dos tradicionais produtos lácteos fermentados (iogurte e queijo, por exemplo), também já foram introduzidas cepas específicas de *Lactobacillus* para fermentação de alimentos de origem vegetal (KIM; KIM; KANG, 2019; WU et al., 2020). Todavia, investigações abordando os impactos da fermentação com lactobacilos probióticos sobre compostos bioativos em coprodutos de processamento de frutas tropicais ainda são escassos.

Diante do exposto, neste estudo objetivou-se realizar a fermentação de coprodutos do processamento de acerola e goiaba, com cepas potencialmente probióticas de *Lactobacillus plantarum* 53, *L. paracasei* 106, *L. casei* L-26 e *L. fermentum* 56, a fim de avaliar o possível efeito deste processo no conteúdo de compostos bioativos e na atividade antioxidante desses coprodutos.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 FRUTAS E COPRODUTOS DO PROCESSAMENTO DE FRUTAS

O Brasil é um país com larga escala em produção de frutas, sendo a fruticultura uma atividade de grande relevância para geração de renda e desenvolvimento agrícola. Este segmento está presente em todos os Estados brasileiros, sendo responsável pela geração de cerca de 5,6 milhões de empregos, com plantações que englobam mais de 2 milhões de hectares (TRIECHEL, 2016). Nos últimos anos, a produção de frutas superou os 40 milhões de toneladas, o que mantém o Brasil como terceiro maior produtor de frutas do mundo, seguindo China e Índia (IBGE, 2016).

No entanto, é expressiva a geração de coprodutos a partir do processamento de frutas pela agroindústria. Há uma preocupação mundial em relação ao uso de coprodutos industriais, que constituí parte da matéria-prima rejeitada durante o processamento. Entre essas, destacam-se as indústrias de suco e polpa de frutas, uma vez que o bagaço, as cascas e as sementes obtidas como coprodutos são desprezados. Esses coprodutos têm a maior parte de seu uso limitado à indústria de alimentos para animais ou são descartados de forma incorreta, podendo causar sérios danos ambientais (BABBAR et al., 2011; CRIZEL et al., 2013).

Porém, coprodutos oriundos do processamento de frutas têm alto potencial nutricional, uma vez que contêm açúcares, vitaminas e minerais, além de serem ricos em fibras e em outros compostos com propriedades funcionais, tornando-os potenciais substratos para incorporação na dieta humana (SILVA; JORGE, 2014).

Além de seus benefícios a saúde, os coprodutos de frutas e hortaliças são fontes de compostos bioativos naturais, que podem ser usados também para substituir vários agentes artificiais de melhoramento de alimentos e, ao mesmo tempo, enriquecer os alimentos com substâncias biologicamente ativas e nutritivas adicionais. Enriquecer produtos alimentícios com compostos contidos em coprodutos de fruta pode melhorar suas propriedades físicas e químicas (BANERJEE et al., 2017). Coprodutos de frutas são comumente utilizados para extração de substâncias bioativas, como pectinas, lipídios, fibras alimentares ou flavonoides (KIM et al., 2012).

2.1.1 Acerola (*Malpighia emarginata* D.C.)

A acerola (*Malpighia emarginata* D.C.), também conhecida como “Cereja das Antilhas” ou “Cereja de Barbados”, é a fruta da aceroleira, originária do Caribe, América Central e norte da América do Sul. É um fruto tropical, de grande potencial econômico e nutricional, cujo interesse agroindustrial deve-se principalmente pela sua composição de vitamina C e atividade antioxidante (JAESCHKE; MARCZAK; MERCALI, 2016; MEZADRI et al., 2008).

O Brasil, favorecido pela sua posição geográfica, condições de solo e clima, é considerado como o maior produtor de acerola a nível mundial, chegando a cultivar mais de 40 variedades de acerola (LEFFA et al., 2014; CAVICHIOLI et al., 2014). Com plantios em praticamente todos os estados, destacando Bahia, Ceará, Paraíba e Pernambuco que são responsáveis por, aproximadamente, 60% da produção nacional, seguida pela região sudeste, que é responsável por, aproximadamente, 15% (FURLANETO; NASSER, 2015).

Caracteriza-se por ser uma fruta pequena, carnosa, variando na sua forma, tamanho e peso, com tonalidades diferentes, verde quando em desenvolvimento, passando a amarelo e vermelho-escuro quando no estágio de maduro, sendo constituída pelo epicarpo (casca externa), mesocarpo (polpa da fruta) e o endocarpo (constituído de três caroços unidos), que dá a fruta aspecto trilobado (Figura 1) (ALMEIDA et al., 2011; BATAGLION et al., 2015). Seu aroma e composição química dependem das condições climáticas e do estágio de maturação da fruta (NOGUEIRA, 2002).

Figura 1 - Acerola (*Malpighia emarginata* D.C.).



Fonte: Marques, 2008.

O fácil cultivo, sabor agradável e elevada capacidade de aproveitamento agroindustrial da acerola, amplia a forma de utilização e consumo deste fruto, podendo ser consumida *in natura* ou industrializada na forma de sucos, polpas, creme, sorvete, doces, geleias, licores, entre outros (JAESCHKE; MARCZAK; MERCALI, 2016).

A acerola apresenta antioxidantes naturais em sua composição, pois contém nutrientes e compostos bioativos como compostos fenólicos, flavonoides, tiamina, riboflavinas, niacina, antocianinas e carotenoides, além de minerais como ferro e cálcio (BENJAMIN et al., 2015). Os antioxidantes são substâncias que retardam ou previnem significativamente à oxidação de lipídeos ou outras moléculas ao inibirem a iniciação ou a propagação da reação de oxidação em cadeia, além de previnirem ou repararem danos ocasionados às células pelas espécies reativas de oxigênio (PRAKASH et al., 2016), auxiliando na prevenção e combate de doenças degenerativas, câncer e envelhecimento precoce (DEMBITSKY et al., 2011).

Estima-se que 40% em volume das frutas enviadas para a indústria do processamento de acerola se tornam coprodutos. Por se tratar de um material com destacável composição nutricional e potencial antioxidante, enfatiza-se a necessidade do aproveitamento industrial de coprodutos do processamento da acerola, promovendo maior desenvolvimento do agronegócio (LEFFA et al., 2014; FURLANETO; NASSER, 2015).

2.1.2 Goiaba (*Psidium guajava* L.)

A goiaba (*Psidium guajava* L.) é uma fruta tropical nativa das Américas, amplamente cultivada em regiões tropicais e subtropicais (ALVAREZ-SUAREZ et al., 2018), sendo considerada uma das frutas tropicais de maior popularidade para a agroindústria, devido ao seu elevado valor nutritivo e excelente aceitação de consumo *in natura* (MAIA; FIGUEIREDO; SANTOS, 2002).

O Brasil é o terceiro maior produtor de goiabas do mundo, com produção de aproximadamente 424 mil toneladas por ano e 324 espécies diferentes (THOMAZ, 2014; TRIE-CHEL, 2016).

A goiabeira é uma planta de pequeno porte, que pode atingir de 3 a 6 metros de altura. A fruta apresenta forma arredondada ou baga globosa, ovoides ou piriforme, de 4 a 12 cm de comprimento (Figura 2) (ALVES; FREITAS, 2007). Por ser uma fruta versátil, a goiaba pode ser consumida *in natura* ou transformada em sucos, compotas, recheios de torta e outros produtos. Esta fruta e seus coprodutos têm potencial para serem incorporados a alimentos proces-

sados mais saudáveis devido às suas características sensoriais e à presença de compostos bioativos (LIMA et al., 2019).

Figura 2 - Goiaba (*Psidium guajava* L.).



Fonte: Marques, 2008.

A goiaba é uma fruta rica em compostos bioativos e com propriedades antioxidantes, devido sua composição em compostos fenólicos, vitamina C, carotenoides, minerais e fibras. Os múltiplos grupos hidroxila presentes nas estruturas químicas de compostos fenólicos atuam como antioxidantes doando íons H^+ aos radicais livres, estabilizando e interrompendo as reações em cadeia da oxidação (SHI et al., 2005; GÜLÇİN, 2012). Substâncias antioxidantes podem ser usadas para retardar a oxidação em alimentos, bem como para desenvolver produtos alimentícios com propriedades funcionais (GÜLÇİN, 2012).

Estima-se que 55% do volume total de goiaba produzida no Brasil seja processada, o que corresponde a, aproximadamente, 233 mil toneladas, resultando em uma produção de 70 mil toneladas de coprodutos, os quais são, na sua maioria, descartados, mesmo apresentando elevada quantidade de compostos bioativos. (LIMA et al., 2019; TRIECHEL, 2016). Por esse motivo, torna-se importante o desenvolvimento de estratégia para utilização de coprodutos do processamento de goiaba como ingrediente funcional para o desenvolvimento de novos alimentos.

2.2 COMPOSTOS BIOATIVOS EM FRUTAS E COPRODUTOS DE FRUTAS

Os compostos bioativos são metabólitos secundários presentes nos tecidos vegetais, considerados como constituintes nutricionais extras que ocorrem naturalmente em pequenas quantidades (CROZIER; JAGANATH; CLIFFORD, 2006; KRIS-ETHERTON et al., 2002).

Os compostos bioativos incluem vitaminas, e um grupo de compostos conhecidos como polifenóis ou compostos fenólicos totais, além de pigmentos de grau alimentício (CROZIER; JAGANATH; CLIFFORD, 2006).

Em geral, compostos bioativos demonstram propriedades antioxidantes (KIM, PADILLA-ZAKOUR; GRIFFITHS, 2016), anti-inflamatórias (VINCENT; BOURGUIGNON; TAYLOR, 2010), contribuem para a alteração do perfil lipídico (WANG et al., 2011) e possuem efeitos antitumorais (STAN et al., 2008). Além de propriedades benéficas para a saúde humana, estes compostos são responsáveis pela cor, sabor e odor de frutas (MIGLIO et al., 2008). Seu conteúdo é influenciado pelo tipo de cultura, variedade, condições ambientais, localização, germinação, maturidade, processamento e formas de armazenamento (BJÖRKMAN et al., 2011; CARBONE et al., 2011).

Dentre os compostos bioativos, destaca-se os compostos fenólicos, que são compostos aromáticos distribuídos de acordo com sua estrutura em ácidos fenólicos, estilbenos e flavonóides (flavanóis, flavanonas, flavonóis e antocianinas) (ZHENG; MEENU; XU, 2019). Compostos fenólicos nos alimentos têm atraído interesse não só por causa de seus benefícios para a saúde, mas também devido às suas características antimicrobianas e seu impacto em atributos sensoriais dos alimentos, incluindo sabor, adstringência e cor dos alimentos vegetais (DANTAS et al., 2019; RODRIGUEZ et al., 2009; ZHENG; MEENU; XU, 2019).

Os benefícios que os composto fenólicos trazem para a saúde parecem ser parcialmente dependentes da sua conversão microbiana (SELMA et al., 2009), que pode ocorrer *in situ* após lesão do tecido vegetal, durante o processamento de alimentos, particularmente durante a fermentação, e pela microbiota intestinal humana após a ingestão (REQUENA et al., 2010). A fração fenólica não absorvível permanece disponível no cólon junto com outros componentes alimentares e é transformada pela microbiota colônica em metabólitos mais ativos e melhor absorvidos (GONÇALVES et al., 2019, ROCCHETTI et al., 2019).

Além dos compostos fenólicos, os carotenoides também se destacam como importantes compostos bioativos, e são pigmentos naturais lipossolúveis responsáveis pelas cores amarela, laranja e vermelha em várias frutas e hortaliças (GAMMONE; RICCIONI; D'ORAZIO, 2015; NAMITHA; NEGI, 2010). Os carotenóides são classificados em dois grupos com base em grupos funcionais; xantofilas, contendo oxigênio como grupo funcional, incluindo luteína e zeaxantina e carotenos, que contêm apenas cadeias de hidrocarbonetos originais sem qualquer grupo funcional, como α -caroteno, β -caroteno e licopeno (MELÉNDEZ-MARTÍNEZ et al., 2008). Frutas e hortaliças são fonte de carotenóides e desempenham papel

importante na dieta devido à atividade da vitamina A. Além disso, os carotenóides também são importantes para a atividade antioxidante, comunicação intercelular e atividade do sistema imunológico (SKIBSTED, 2012; STEPHENSEN, 2013).

As vitaminas também merecem destaque, visto que frutas e seus coprodutos são fonte deste composto bioativo (GEBBERS, 2007) e fornecem 50% da Ingestão Diária Recomendada (IDR) para a vitamina C (PENNINGTON; FISHER, 2010). As vitaminas desempenham papel importante na saúde, uma vez que são compostos bioativos essenciais para saúde humana, e por serem compostos orgânicos que não podem ser sintetizados em quantidades adequadas pelo organismo, devem ser fornecidos através da dieta (KATOUZIAN; JAFARI, 2016).

Desta forma, devido as suas características de promoção de saúde, intensificaram-se as pesquisas com o objetivo de encontrar coprodutos do processamento de frutas como fonte de compostos bioativos (ALBUQUERQUE et al., 2019; CAMPANELLA et al., 2017; LIMA et al., 2019). Além disso, coprodutos de frutas que, na maioria das vezes, são descartados de forma incorreta, causando grandes prejuízos econômicos e ambientais, poderiam ser utilizados pela indústria de alimentos e de biotecnologia no processamento de outros produtos, aumentando o seu potencial funcional.

2.3 EFEITOS DA FERMENTAÇÃO POR BAL NO CONTEÚDO DE COMPOSTOS BIOATIVOS DE ALIMENTOS

As BAL são microrganismos gram-positivos, não formadores de esporos, que podem apresentar morfologia de cocos ou bacilos (KLAENHAMMER et al., 2002). São oxidase e catalase negativos, não redutoras de nitratos a nitritos e incapazes de utilizar lactato, apesar de que acumulam ácido lático no ambiente onde se multiplicam, como produto do metabolismo primário. Estas bactérias multiplicam-se em temperaturas que variam de 5 a 45 °C com condições ótimas de pH entre 5,5 a 6,5 (SAARELA et al., 2009; VODNAR et al., 2010) e são anaeróbias ou anaeróbias facultativas (CARR; CHILL; MAIDA, 2002).

O grupo de BAL é constituído pelos gêneros *Aerococcus*, *Alloiococcus*, *Carnobacterium*, *Dolosigranulum*, *Enterococcus*, *Globicatella*, *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Lactosphaera*, *Leuconostoc*, *Mlissococcus*, *Oenococcus*, *Pediococcus*, *Streptococcus*, *Tetragenococcus*, *Vagococcus* e *Weisella* (RUAS-MADIEDO et al., 2012). Dentre estes, os gêneros *Lactococcus*, *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Streptococcus* e *Pediococcus* são os mais frequentemente

utilizados como cultura *starter* na fermentação de vegetais, produtos lácteos e cárneos (HLADÍKOVÁ et al., 2012; NIETO-LOZANO et al., 2010).

Este grupo de bactérias tem a capacidade de sintetizar ácidos orgânicos, como os ácidos lático e acético. O ácido lático é um composto valioso para a preservação de alimentos, uma vez que é capaz de controlar a acidez dos produtos fermentados e inibir microrganismos patogênicos e deteriorantes, aumentando a segurança e vida de prateleira destes produtos (AMALARADJOU; BHUNIA, 2012; MEDINA, 2011).

Ao longo do seu histórico de uso em alimentos fermentados, as BAL são muito citadas na fermentação de derivados lácteos e mais atualmente em produtos não lácteos (LEROY; DE VUYST, 2014; SHORI, 2016) (Quadro 1). Portanto, há um crescente interesse na utilização dessas bactérias na fermentação de coprodutos agroindustriais do processamento de frutas, podendo estes ser direcionados para o desenvolvimento de novos produtos atrativos com propriedades bioativas (REQUE et al., 2014).

As BAL são capazes de produzir, liberar e/ou aumentar a concentração de compostos bioativos específicos em alimentos fermentados, (LEBLANC et al., 2017) tais como vitaminas, peptídeos e lipídios bioativos e enzimas (SOUZA, 2012). Entre as várias opções tecnológicas, a fermentação por BAL pode ser considerada uma biotecnologia simples e efetiva para manter e/ou melhorar as propriedades de segurança, nutricionais, sensoriais e de vida útil de frutas e hortaliças (HAALAND, 2007; HUSSAIN et al., 2016; RODRIGUEZ et al., 2009).

O processo de fermentação é responsável por estimular a produção de metabólitos secundários, uma vez que, com o auxílio dos microrganismos presentes, ocorre a modificação dos constituintes vegetais, com a liberação dos compostos quimicamente ligados (MIGLIO et al., 2008; YEO; EWE; 2015).

Campanella et al. (2017) obteve resultados positivos ao fermentar coproduto de uva com cepas de *Lactobacillus plantarum* 12A e PU1, *L. Paracasei* e *Bifidobacterium breve* 15A, o que resultou no aumento da atividade antioxidante do coproduto de uva fermentado. A fermentação de extrato de amora por *L. brevis* DF01 e *Pediococcus acidilactici* K10 exerceu atividade antibacteriana contra *Salmonella Typhimurium* e atividade anti-inflamatória nas células epiteliais intestinais (KIM; KIM; KANG, 2019). Kwaw et al. (2018), observaram um aumento no conteúdo de antocianinas, compostos fenólicos, flavonóides e atividade antioxidante ao fermentar suco de amoreira com cepas de *L. plantarum*, *L. casei* e *L. acidophilus*.

Quadro 1 – Alimentos não lácteos fermentados por BAL.

Matrizes Fermentadas	BAL	Principais Resultados	Referência
Coproduto de uva	<i>Lactobacillus plantarum</i> 12A e PU1, <i>L. paracasei</i> e <i>Bifidobacterium breve</i> 15A	↑ da atividade antioxidante	CAMPANELLA et al., 2017
Chocolate ao leite	<i>L. plantarum</i> HM47	↓ de Enterobactérias e ↑ das BAL, potencial funcional e probiótico	NAMBIAR; SELLA-MUTHU; PERUMAL, 2018.
Extrato de amora	<i>Lactobacillus brevis</i> DF01 e <i>Pediococcus acidilactici</i> K10	Atividade antibacteriana contra <i>Salmonella Typhimurium</i> , atividade anti-inflamatória nas células epiteliais intestinais	KIM; KIM; KANG, 2019
Farinha de leguminosas	<i>L. plantarum</i> T0A10, 18S9, LB1, MRS1 e MR10 <i>Pediococcus acidilactici</i> 10MM0, <i>Leuconostoc mesenteroides</i> 12MM1, <i>L. rossiae</i> LB5 e <i>L. brevis</i> MRS4	↑ de aminoácidos livres, ↓ da atividade inibidora da tripsina e índice de hidrólise do amido, ↑ da atividade de eliminação de radicais livres	PASQUALE et al., 2019
Macarrão de quinoa	<i>L. plantarum</i>	Prevenção de deficiências de vitaminas e minerais em modelo de roedores	CARRIZO et al., 2020
Pão fortificado com coproduto de cevada, emmer e trigo pigmentado	<i>L. plantarum</i> e <i>Weissella confusa</i>	↑ características nutricionais e funcionais dos farelos fermentados	PONTONIO et al., 2020
Pão sem glúten	<i>Weissella cibaria</i> CH28, <i>L. plantarum</i> FUA3171 e <i>L. fermentum</i> FUA3165	↑ proteínas, fibras e ácidos graxos essenciais (ácido linolênico ω-3)	MAIDANA et al., 2018
Suco de amoreira	<i>L. plantarum</i> , <i>L. acidophilus</i> e <i>L. paracasei</i> .	↑ de antocianina, compostos fenólicos, flavonoides e atividade antioxidante	KWAW et al., 2018
Suco de caju	<i>L. plantarum</i> , <i>L. casei</i> e <i>L. acidophilus</i>	↑ da vitamina C, compostos fenólicos e atividade antioxidante.	KAPRASOB et al., 2017
Salsichas	<i>Lactobacillus sakei</i> , <i>L. curvatus</i> , <i>L. plantarum</i> , <i>Lactococcus piscium</i> e <i>Leuconostoc gelidum</i> .	↓ do teor de gordura e do pH	HILBIG et al., 2019
Sardinha (<i>Sardinella aurita</i>)	<i>L. plantarum</i> FI 8595 e <i>Pediococcus acidilactici</i> ATCC 25741	Aumento da vida de prateleira de sardinhas fermentadas sob refrigeração	KULEY et al., 2018

↑: Aumento; ↓: Diminuição.

Os resultados obtidos nestes estudos comprovam que a fermentação por cepas de *Lactobacillus* são eficientes no aumento da quantidade de compostos bioativos e da atividade antioxidante de alimentos fermentados, além do efeito positivo relacionado à promoção de saúde. Novas aplicações para os coprodutos de frutas são necessários para a indústria, sendo a fermentação uma tecnologia que merece atenção, uma vez que através desta pode-se proporcionar um substrato rico em compostos bioativos, atividade antioxidante, presença de bactérias probióticas e apelo funcional, criando novas oportunidades para a produção de alimentos funcionais e/ou suplementos alimentares.

Há um crescente interesse por parte da população em consumir frutas devido ao seu alto valor nutricional e terapêutico, visto sua riqueza em compostos bioativos, que desempenham atividades antioxidantes. Além disso, há uma porcentagem relevante de desperdício destas frutas pela indústria de processamento de frutas, gerando coprodutos ricos em compostos bioativos. Desta forma, o estudo do processo de fermentação de coprodutos de acerola e goiaba por *Lactobacillus* probióticos, torna-se importante, por possibilitar avaliar os efeitos desse processamento na obtenção de coprodutos mais ricos em compostos bioativos e, consequentemente, com maior atividade antioxidante; bem como possibilita o melhor destino destes insumos, podendo ser aproveitados pela indústria alimentícia e de alimentos funcionais, considerando seus aspectos biotecnológicos.

3 MATERIAL E MÉTODOS

Os experimentos foram conduzidos no Laboratório de Microbiologia e Bioquímica de Alimentos (LMBA) (realização da fermentação) e Laboratório de Bromatologia (LB) (avaliação dos parâmetros físico-químicos), pertencentes ao Departamento de Nutrição, Centro de Ciências da Saúde (CCS), Universidade Federal da Paraíba (UFPB), *Campus* I, João Pessoa - PB; no Laboratório de Bromatologia (LABROM) (determinação dos compostos fenólicos e flavonoides totais, carotenoides e atividade antioxidante), Unidade Acadêmica de Saúde (UAS), Centro de Educação e Saúde (CES), Universidade Federal de Campina Grande, *Campus* de Cuité - PB; no Laboratório Experimental de Alimentos (LEA) (avaliação do perfil de compostos fenólicos), Departamento de Tecnologia de Alimentos, Instituto Federal do Sertão Pernambucano, Petrolina – PE; e no Laboratório de Processamento de Alimentos (LPA) (determinação do teor de ácido ascórbico), Centro de Tecnologia e Desenvolvimento Regional (CTDR), UFPB, João Pessoa – PB.

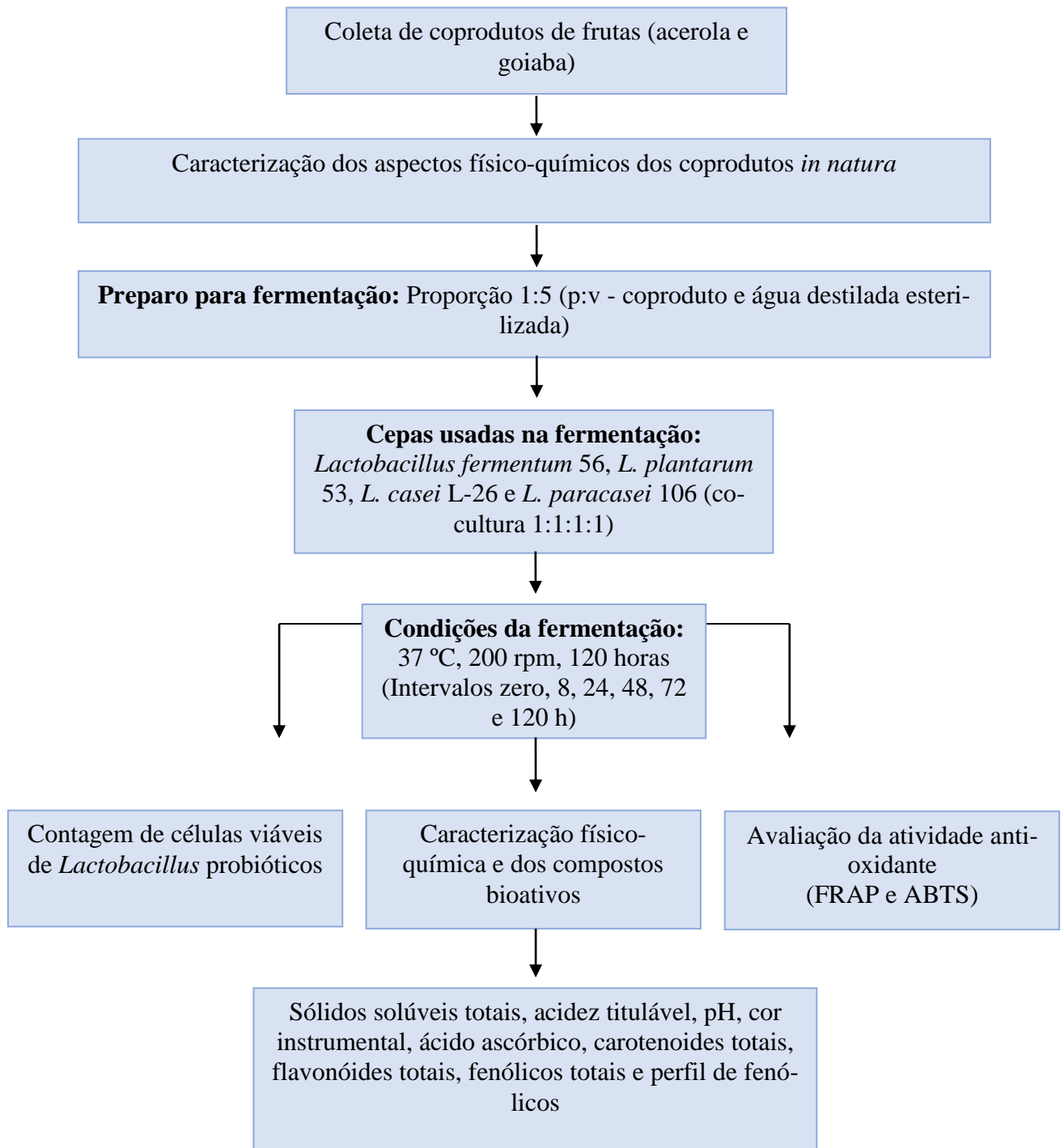
3.1 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL

O desenho dos experimentos que compõem esse estudo apresenta-se na figura 1. Todos os ensaios foram realizados em triplicatas, em duas ocasiões diferentes.

3.2 OBTENÇÃO E PREPARAÇÃO DOS COPRODUTOS DE FRUTAS

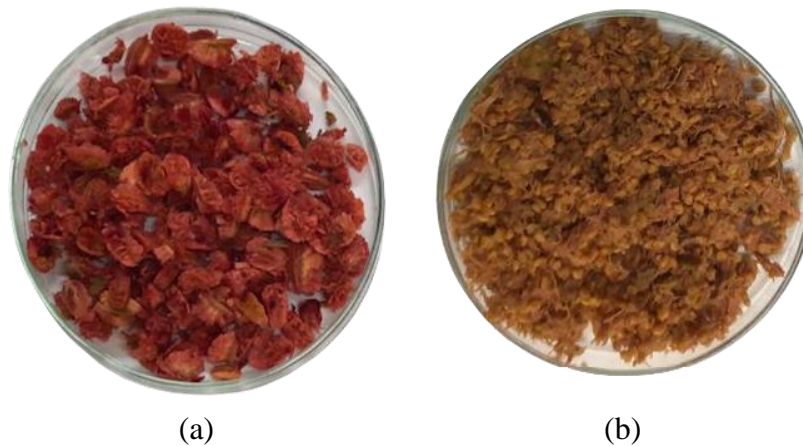
No presente estudo utilizaram-se coprodutos do processamento de acerola (*Malpighia emarginata* D.C.) e goiaba (*Psidium guajava* L.) (Figura 4), obtidos da empresa Pé de Fruta da cidade de João Pessoa - PB. As amostras (aproximadamente 500 g cada) foram coletadas de quatro lotes de processamento de frutas, agrupados por um total de, aproximadamente, seis kg para cada espécie de fruta. Cada tipo de coproduto foi embalado separadamente em embalagens comercialmente esterilizadas, colocados em caixas isotérmicas com gelo e transportadas para o Laboratório de Bioquímica e Microbiologia de Alimentos da Universidade Federal da Paraíba, *Campus* I – João Pessoa - PB, onde foram acondicionados em sacos plásticos resistentes ao calor, autoclavados (Phoenix Lufarco, AV 300, Araraquara, São Paulo, Brasil) (121 °C, 1 atm, 15 min) e armazenados a -18 ± 2 °C em sacos de polipropileno hermeticamente fechados, até a realização dos ensaios.

Figura 3. Delineamento experimental do estudo.



Fonte: Próprio autor, 2020.

Figura 4. Coprodutos do processamento de acerola (a) e goiaba (b), antes da fermentação.



Fonte: Próprio autor, 2020.

3.3 MICRORGANISMOS E PREPARAÇÃO DO INÓCULO

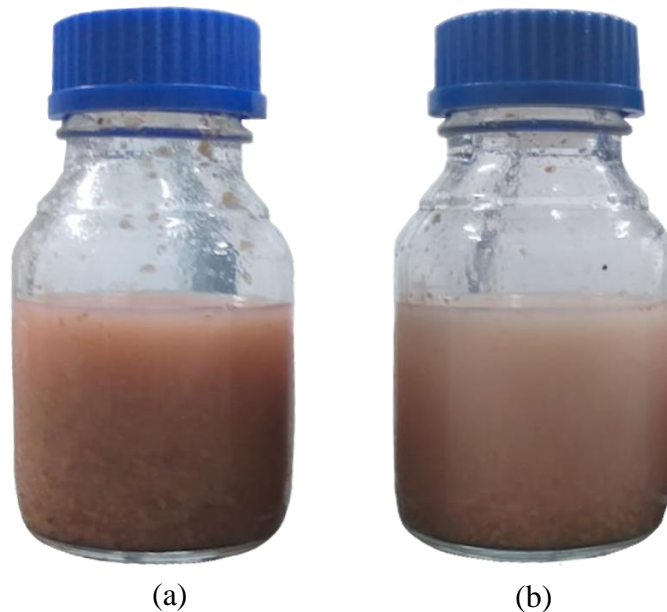
As cepas de *Lactobacillus* potencialmente probióticas, nomeadas de *L. plantarum* 53, *L. paracasei* 106 e *L. fermentum* 56, foram isoladas de coprodutos de frutas e anteriormente caracterizadas como potencialmente probióticas, por meio de testes que garantiram a sua segurança e funcionalidade fisiológica *in vitro*, sendo identificadas por sequenciamento do gene 16S rRNA (GARCIA et al., 2016), e foram obtidas do banco de Coleção de Microrganismos do Laboratório de Microbiologia e Bioquímica de Alimentos (LMBA). A cepa *L. casei* L-26 (DUARTE, et al. 2017), foi obtida da Coleção de Microrganismos, da Faculdade de Biotecnologia, Universidade Católica Portuguesa (Porto, Portugal). As culturas estoque foram mantidas em caldo de Man, Rogosa e Sharpe (MRS; HiMedia, Mumbai, Índia) contendo glicerol (150 g/L) a uma temperatura de -18 ± 2 °C.

Para preparação do inóculo, as cepas testes de *Lactobacillus* foram cultivadas individualmente de forma anaeróbica (Anaerogen System Anaerogen, Oxoid, Wade Road, Basingstoke, Reino Unido) em caldo MRS a 37 °C até atingir a fase estacionária (20-24 h). A massa celular foi coletada por centrifugação ($4000 \times g$, 10 min, a 4 °C), lavada duas vezes em solução salina esterilizada (NaCl 8,5 g/L) e ressuspendida em água destilada esterilizada. Essas suspensões forneceram contagens de células viáveis de, aproximadamente, $10 \log$ UFC/mL (com leitura da densidade óptica (OD) a 625 nm (OD₆₂₅) correspondendo a 1,5).

3.4 FERMENTAÇÃO DOS COPRODUTOS DE ACEROLA E GOIABA

Para preparação dos fermentados uma proporção de 1:5 (p:v) dos coprodutos diluídos em água destilada esterilizada foi utilizada. Posteriormente, a massa celular (*pellet*) de cada cepa testada de *Lactobacillus* foi adicionada em co-cultura (proporção de 1:1:1:1) nos coprodutos de acerola (ACE) e goiaba (GOI) e submetidos à fermentação sob aerobiose em agitador orbital (Tecnal, TE-424, Piracicaba, São Paulo, Brasil), a uma temperatura controlada de 37 °C, com agitação de 200 rpm (Rotação por Minuto) durante 120 horas ininterruptas. Durante os intervalos dos tempos zero (Figura 5), 8, 24, 48, 72 e 120 horas de fermentação, foi realizada a contagem de células viáveis dos coprodutos fermentados.

Figura 5. Coprodutos de acerola (a) e goiaba (b) no tempo 0 da fermentação.



Fonte: Próprio autor, 2020.

3.4.1 Contagem de células viáveis de *Lactobacillus* probióticos durante a fermentação de ACE e GOI

Para a contagem de células viáveis de *Lactobacillus* probióticos nos coprodutos fermentados, uma amostra de cada tratamento nos intervalos de tempos citados anteriormente foi diluída em solução salina (NaCl 8,5 g/L), e, em seguida, homogeneizada e diluída em série (1:9, 10^{-1} a 10^{-6}) com o mesmo diluente. Uma amostra de 10 μ L de cada diluição foi inocula-

da em placas de ágar MRS (HiMedia), usando a técnica de inoculação por microgota (HERIGSTAD; HAMILTON; HEERSINK, 2001) e incubadas durante 48 horas a 37 °C sob anaerobiose (Anaerogen System Anaerogen, Oxoid). Os resultados foram expressos em log UFC/mL em cada intervalo de tempo monitorado. O limite de detecção dos ensaios para contagem de células viáveis foi 1 log UFC/mL.

3.5 CARACTERIZAÇÃO E AVALIAÇÃO DOS COMPOSTOS BIOATIVOS E DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DOS COPRODUTOS ANTES E DURANTE A FERMENTAÇÃO

Os coprodutos antes e após a fermentação, foram caracterizados, nos tempos zero, 48, 72 e 120 horas, de acordo com os seguintes parâmetros: cor, pH, acidez titulável e sólidos solúveis totais (°Brix). Ainda foram determinados os compostos bioativos (perfil e total de compostos fenólicos, flavonoides totais, carotenoides totais e vitamina C) e a atividade antioxidante (ABTS e FRAP) dos coprodutos ao longo da fermentação, segundo metodologias descritas a seguir.

3.5.1 Determinação das características físico-químicas

Cor: A cor dos coprodutos foi avaliada pelo sistema CIELab: L* (0: escuro, 100: branco), a* (valor negativo: verde, valor positivo: vermelho) e b* (valor negativo: azul, valor positivo: amarelo) de acordo com a Comissão Internacional de Iluminação (CIE, 1986). O cálculo do ângulo Hue (°Hue) e croma (C) foi realizado, segundo Liu et al. (2010), por meio das seguintes equações: $^{\circ}\text{Hue} = \arctan(b^*/a^*)$ e $C = (a^{*2} + b^{*2})^{1/2}$.

pH: Os valores de pH foram determinados em 10 g da amostra homogeneizada utilizando um potenciômetro com eletrodo de vidro combinado (Modelo Q400AS, São Paulo, Brasil), calibrado com solução tampão pH 7,0 e 4,0 (AOAC, 2016).

Acidez titulável (AT): A AT foi determinada por titulometria com NaOH 0,1 M na presença de fenolftaleína como indicador de modificação de pH. Para o cálculo, utilizou-se a fórmula: $AT (\%) = V \times f \times 100 / P \times c$, onde 'V' é número de mL da solução de hidróxido de sódio 0,1 ou 0,01 M gasto na titulação, 'f' é o fator de correção da solução de hidróxido de sódio 0,1 ou 0,01 M, 'P' é o número de g da amostra usado na titulação e 'c' é a correção para

solução de NaOH 1 M (10 para solução NaOH 0,1 M e 100 para solução NaOH 0,01 M) (AOAC, 2016). Os resultados foram expressos em g/100 g da amostra.

Sólidos solúveis totais (°Brix): Amostras de cinco gramas dos coprodutos foram homogeneizadas com um processador doméstico (Philips Walita, São Paulo, Brasil) e analisadas utilizando um refratômetro digital (HI96801, HANNA® instruments, São Paulo, Brasil). Os resultados foram expressos como g de SST/100 g da amostra (GUERRA et al., 2016).

3.5.2 Determinação do conteúdo de ácido ascórbico e carotenoides totais

O conteúdo de ácido ascórbico foi determinado segundo o método de Tillman's, usando a solução de corante 2,6-diclorofenol-indofenol. O conteúdo total de ácido ascórbico foi expresso em mg por 100 g da amostra (mg/100g) (AOAC, 2016).

Para determinação de carotenoides totais, utilizou-se a metodologia empregada por Lichtenthaler e Buschmann (2001). Para tal, foi pesado 1 grama da amostra em tubos de ensaio envoltos com papel alumínio, em seguida, 10 mL de acetona foi adicionada em cada tubo, agitada por 30 segundos em agitador de tubos (modelo AP56, Phoenix Lufenco, Araraquara, São Paulo, Brasil) e filtrado em papel filtro qualitativo (40 Whatman®, 125mm). A amostra foi lida em espectrofotômetro (SP-1102, BEL Photonics, Piracicaba, São Paulo, Brasil) nos comprimentos de onda de 470 nm, 645 nm e 662 nm, contra o branco constituído de acetona. O conteúdo total de carotenoides foi expresso em mg por 100 g da amostra (mg/100).

3.5.3 Determinação do conteúdo total de fenólicos e flavonoides

Para as análises do conteúdo total de fenólicos e flavonoides foi preparado um extrato das amostras. Para tal, 2 g dos coprodutos foram homogeneizados em 10 mL de metanol (Merck, Darmstadt, Alemanha) a 80% por 10 min usando um mini-Turrax (TE-102, Tecnal, Piracicaba, São Paulo, Brasil); após homogeneização, os extratos foram mantidos em descanso por 24 horas e, posteriormente, filtrados com um papel de filtro de 125 mm (Whatman®, GE Healthcare, Chicago, IL, USA).

O conteúdo de fenólicos totais foi analisado utilizando o método de Folin-Ciocalteu. Para tal, 250 µL de cada extrato foram misturados em tubo de ensaio com 1250 µL do reagente Folin-Ciocalteu a 10%. As soluções foram agitadas em Vortex (Q220M, Quimis, Diadema, São Paulo, Brazil) e armazenadas em temperatura ambiente ($25 \pm 0,5$ °C) na ausência

da luz por 6 min. Após, foram adicionados 1 mL da solução de carbonato de sódio a 7,5%. A mistura foi levada ao banho maria (Modelo BS-3030, Raypa, Barcelona, Espanha) a uma temperatura de $50 \pm 0,5$ °C durante 5 min. Após, a absorvância foi medida a 765 nm utilizando espectrofotômetro (BEL Photonics). Também foi realizado um branco com a ausência dos extratos para zerar o espectrofotômetro. O conteúdo de compostos fenólicos totais das amostras foi determinado utilizando uma curva padrão preparada com ácido gálico (Sigma-Aldrich, St. Louis, MA, USA). Os resultados foram expressos em mg equivalentes de ácido gálico (EAG) por 100 gramas de amostra (mg EAG/100 g) (LIU et al., 2002).

Ainda, determinou-se o teor total de flavonoides, segundo metodologia descrita por Guevara-Figueroa et al. (2010). Uma alíquota de 0,5 mL dos extratos fenólicos foram adicionados a 2 mL de água destilada em um tubo de ensaio. Em seguida, adicionaram-se 150 µL de nitrito de sódio a 5%. Após 5 min, 150 µL de cloreto de alumínio a 10% foram adicionados e, após 6 min, 1 mL de hidróxido de sódio a 1 M, seguido pela adição de 1,2 mL de água destilada. A absorvância da amostra foi medida a 510 nm usando um espectrofotômetro (BEL Photonics) contra um branco na ausência dos extratos. O teor de flavonoides totais foi determinado usando uma curva padrão de equivalentes de catequina (EC) (Sigma-Aldrich). Os resultados foram expressos em mg equivalentes de catequina (EC) por 100 gramas de amostra (mg EC/100 g).

3.5.4 Determinação do perfil dos compostos fenólicos

O extrato das amostras foi obtido a partir de 5 gramas dos coprodutos homogeneizados em 5 mL de metanol a 80% (Sigma Aldrich), os quais foram centrifugados ($9000 \times g$, 15 min, 4 °C) e filtrados em filtros de polipropileno com membranas de 0,45 µm (Millex Millipore, Barueri, SP, Brasil).

Os compostos fenólicos individuais foram determinados seguindo a metodologia validada por Padilha et al. (2017), com adaptações em gradiente e tempo de execução para quantificação de estilbenos, flavonóis e flavonas, utilizando um cromatógrafo líquido Agilent 1260 Infinity System LC (Agilent Technologies, Santa Clara - EUA) acoplado a um detector de arranjo de diodo (DAD) (G1315D). A coluna utilizada foi a Zorbax Eclipse Plus RP-C18 ($100 \times 4,6$ mm, 3,5 µm) e a pré-coluna foi a Zorbax C18 ($12,6 \times 4,6$ mm, 5 µm) (Zorbax, EUA). A temperatura do forno foi de 35 °C e o volume de injeção foi de 20 µL da amostra, previamente diluída na fase A, e filtrada através de membrana de 0,45 µm (Millex Millipore). O

fluxo de solvente foi de 0,8 mL/min. O novo gradiente utilizado na separação foi de 0 a 5 min: 5% B; 5 a 14 min: 23% de B; 14 a 30 min: 50% de B; 30-33 min: 80% B, em que o solvente A era uma solução de ácido fosfórico (0,1 M, pH = 2,0) e o solvente B era metanol acidificado com 0,5% de H₃PO₄. Os dados foram processados usando o software OpenLAB CDS ChemStation Edition (Agilent Technologies, Santa Clara-EUA). A detecção dos compostos foi realizada a 220, 280, 320, 360 e 520 nm, e a identificação e quantificação foram feitas por comparação com padrões externos (Sigma-Aldrich). Os resultados foram expressos em mg de compostos fenólicos para 100 g da amostra (mg/100 g).

3.5.5 Atividade Antioxidante

Métodos distintos foram empregados para avaliar a atividade antioxidante dos coprodutos de frutas fermentados, os quais foram: ABTS (2,2-azino-bis (3-etilbenzo-tiazoline)-6-sulfonic acid) e FRAP (*Ferric reducing ability of plasma*).

Previamente, preparou-se um extrato de cada coproduto. Para isso, 2 g da amostra foi homogeneizada em 10 mL de metanol (Merck) a 80% por 10 min usando um mini-Turrax (Tecnal), após homogeneização, os extratos foram mantidos em descanso por 24 horas, seguindo-se por filtração em papel filtro qualitativo 125 mm (Whatman[®]).

Capacidade Redutora de Ferro – FRAP: a capacidade dos extratos em reduzir o íon férrico (Fe³⁺) a íon ferroso (Fe²⁺) foi determinada pelo método FRAP, adaptado segundo Rockenbach et al. (2011). Inicialmente, preparou-se o reagente FRAP com solução tampão acetato de sódio anidro 0,3 M (pH 3,6), TPTZ (2,4,6-tris (2-pyridyl)-s-triazine) a 10 mM/L em uma solução de HCl a 40 mM e cloreto férrico (FeCl₃) a 20 mM. Em uma alíquota de 200 µL do extrato foram adicionados 1800 µL da solução FRAP. Em seguida, os tubos contendo o extrato e a solução FRAP foram agitados e levados ao banho-maria a 37 °C por 30 min. A absorbância foi medida a 593 nm em espectrofotômetro (BEL Photonics). A curva padrão foi realizada com Trolox 1 mM e os resultados expressos em µM Trolox por g da amostra (µM Trolox/g).

Capacidade antioxidante equivalente a Trolox – ABTS^{•+}: a capacidade dos extratos em capturar o cátion ABTS^{•+} (2,2-azino-bis (3-etilbenzo-tiazoline)-6-sulfonic acid), foi determinada pelo método ABTS^{•+}. Inicialmente, preparou-se o reagente ABTS^{•+}, que é obtido

pela reação de 5 mL de ABTS a 7 mM com 88 μ L de persulfato de potássio a 140 mM (concentração final de 2,45 mM), segundo método de Sariburun et al. (2010). Posteriormente, manteve-se em repouso, a temperatura ambiente de 12 a 16 horas em ausência de luz, para formação do ABTS^{•+}. Uma vez formado, o mesmo foi diluído com água destilada até obter valor de absorvância de 0,800 – 0,900 a 734 nm. A leitura da absorvância foi feita a 734 nm em espectrofotômetro (BEL Photonics), com a mistura de reação (600 μ L) contendo 100 μ L da amostra e 500 μ L de solução ABTS^{•+}. Também foi feita uma solução “controle” que consistiu em uma alíquota de 100 μ L do solvente extrator dos extratos adicionada de 500 μ L do radical ABTS^{•+}. A solução “branca” foi o solvente extrator de cada extrato, utilizada para zerar o espectrofotômetro. Como referência, foi utilizado o Trolox e os resultados foram expressos em μ M trolox por g da amostra (μ mol Trolox/g).

3.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Todas os experimentos foram realizadas em triplicata com réplicas independentes e os resultados foram expressos como a média dos testes. As análises estatísticas foram realizadas para determinar diferenças significativas ($p \leq 0,05$) entre os resultados usando o teste t de Student ou análise de variância (ANOVA) seguido pelo teste de Tukey. Essas análises foram realizadas no software computacional GraphPad Prism 6.0 (GraphPad Software Inc., San Diego, CA, USA).

As correlações foram calculadas usando o coeficiente de correlação de Pearson (r). A análise de componentes principais (PCA) foi aplicada para mostrar a matriz de correlação entre contagens de células viáveis, carotenóides totais, flavonóides totais, vitamina C, fenólicos totais, perfil de fenólico e atividade antioxidante dos coprodutos submetidos à fermentação. Para realizar a ACP, foi utilizado o programa XLSTAT versão 2019.2.2.59614 (Addinsoft 2019; solução estatística e análise de dados XLSTAT. Boston, MA, EUA).

4 RESULTADOS

O artigo apresentado no apêndice “Improvements in bioactive compounds and antioxidant activity of acerola (*Malpighia emarginata* D.C.) and guava (*Psidium guajava* L.) fruit industrial coproducts fermented with potentially probiotic lactobacilli” teve como objetivo realizar a fermentação de coprodutos do processamento de acerola e goiaba, com cepas potencialmente probióticas de *Lactobacillus plantraum* 53, *L. paracasei* 106, *L. casei* L-26 e *L. fermentum* 56, a fim de avaliar o efeito da fermentação no conteúdo de compostos bioativos e na atividade antioxidante desses coprodutos. As contagens viáveis de lactobacilos probióticos em ACE e GOI após 120 h de fermentação foram de $\geq 5,5$ log UFC/mL. A fermentação causou aumento na luminosidade e diminuição no contraste de ACE e GOI. O conteúdo de sólidos solúveis totais e os valores de pH diminuíram em ACE e GOI durante a fermentação, com concomitante aumento da acidez titulável. O conteúdo de ácido ascórbico diminuiu em ACE e aumentou em GOI durante a fermentação. ACE e GOI apresentaram aumento no conteúdo de flavonóides totais e fenólicos totais, os quais estiveram possivelmente relacionados com a atividade antioxidante mais elevadas encontrada em ACE e GOI fermentados. Diferentes compostos fenólicos foram encontrados em ACE e GOI durante a fermentação. Os teores de flavonóides totais e fenólicos totais foram correlacionados com a atividade antioxidante na ACE e GOI fermentadas. Assim, a fermentação de coprodutos de acerola e goiaba por cepas de *Lactobacillus* probióticas, pode ser uma estratégia para melhorar o seus conteúdos de compostos bioativos e atividade antioxidante, com potencial propriedades relacionadas à saúde.

REFERÊNCIAS

- ALMEIDA, M. M. B. et al. Bioactive compounds and antioxidant activity of fresh exotic fruits from northeastern Brazil. **Food Research International**, v. 44, p. 2155-2159, 2011.
- ALVAREZ-SUAREZ, J. M. et al. Guava (*Psidium guajava* L. cv. Red Suprema) Crude Extract Protect Human Dermal Fibroblasts against Cytotoxic Damage Mediated by Oxidative Stress. **Plant Foods for Human Nutrition**, v. 73, p. 18-24, 2018.
- ALVES, J. E.; FREITAS, B. M. Requerimentos de polinização da goiabeira. **Ciência Rural**, v. 37, p. 1281-1286, 2007.
- AMALARADJOU, M. A. R.; BHUNIA, A. K. Modern approaches in probiotics research to control foodborne pathogens. **Advances in Food and Nutrition Research**, v. 67, p. 185-239, 2012.
- ARGYRI, A. A. et al. Selection of potential probiotic lactic acid bacteria from fermented olives by *in vitro* tests. **Food Microbiology**, v. 33, p. 282-291, 2013.
- Association of Official Analytical Chemists – AOAC. Official methods of analysis of A.O.A.C. *International, United States, 20th ed*, 2016.
- BABBAR, N. et al. Total phenolic content and antioxidant capacity of extracts obtained from six important fruit residues. **Food Research International**, v. 44, p. 391-396, 2011.
- BALL, S. et al. Analysis of carbohydrates, alcohols, and organic acids by ion-exchange chromatography. **Agilent Hi-Plex Columns Applications Compendium; Agilent Technologies Inc.: Santa Clara, CA, USA**, p. 1-98, 2011.
- BANERJEE, J. et al. Bioactives from fruit processing wastes: Green approaches to valuable chemicals. **Food Chemistry**, v. 225, p. 10-22, 2017.
- BATAGLION, G.A. et al. Determination of the phenolic composition from Brazilian tropical fruits by UHPLC-MS/MS. **Food Chemistry**, v. 180, p. 280-287, 2015.
- BENJAMIN, S. R. et al. Electroanalysis for quality control of acerola (*Malpighia emarginata*) fruits and their commercial products. **Food Analytical Methods**, v. 8, p. 86-92, 2015.
- BJÖRKMAN, M. et al. Phytochemicals of brassicaceae in plant protection and human health – Influences of climate, environment and agronomic practice. **Phytochemistry**, v. 72, p. 538–556, 2011.
- BORTOLOTTI, C.T. et al. Hydrodynamic study of a mixture of west indian cherry residue and soybean grains in a spoutedbed. **Canadian Journal of Chemical Engineering**, v. 91, p. 1871–1880, 2013.
- BUENO, J.M. et al. Analysis and antioxidant capacity of anthocyanin pigments. Part II: Chemical structure, color, and intake of anthocyanins. **Critical Reviews in Analytical Chemistry**, v. 42, p. 126-151, 2012.

- CAMPANELLA, D. et al. Exploitation of grape marc as functional substrate for lactic acid bacteria and bifidobacteria growth and enhanced antioxidant activity. **Food Microbiology**, v. 65, p. 25-35, 2017.
- CARBONE, K. et al. Phenolic composition and free radical scavenging activity of different apple varieties in relation to the cultivar, tissue type and storage. **Food Chemistry**, v. 127, p. 493–500, 2011.
- CARRIZO, S. L. et al. Quinoa pasta fermented with lactic acid bacteria prevents nutritional deficiencies in mice. **Food Research International**, v. 127, p. 1-12, 2020
- CARR, F. J.; CHILL, D.; MAIDA, N. The Lactic Acid Bacteria: A Literature Survey. **Critical Reviews in Microbiology**, v. 28, p. 281–370, 2002.
- CAVICHIOLI, J. C. et al. Reaction in barbados cherry (*Malpighia emarginata* D.C.) to *Meloidogyne enterolobii*. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 36, p. 156-160, 2014.
- CLERICI, M.; CARVALHO-SILVA, L. Nutritional bioactive compounds and technological aspects of smaller fruits grown in Brazil. **Food Research International**, v. 44, p. 1658 – 1970, 2011.
- CRIZEL, T. M. Dietary fiber from orange byproducts as a potential fat replacer. **LWT-Food Science and Technology**, v. 53, p. 9-14, 2013
- CROZIER, A.; JAGANATH, I. B.; CLIFFORD, M. N. Phenols, polyphenols and tannins: an overview. **Plant secondary metabolites: Occurrence, Structure and Role in the Human Diet**, v. 1, 2006.
- LIMA, R. S. et al. May the superfruit red guava and its processing waste be a potential ingredient in functional foods? **Food Research International**, v. 115, p. 451-459, 2019.
- DANTAS, A. M. et al. Bioaccessibility of phenolic compounds in native and exotic frozen pulps explored in Brazil using a digestion model coupled with a simulated intestinal barrier. **Food Chemistry**, v. 274, p. 202–214, 2019
- DEMBITSKY, V. et al. The multiple nutrition properties of some exotic fruits: biological activity and active metabolites. **Food Research International**, v. 44, p. 1671-1701, 2011.
- DE PASQUALE, I. et al. Nutritional and functional effects of the lactic acid bacteria fermentation on gelatinized legume flours. **International Journal of Food Microbiology**, v. 316, p. 1-12, 2020.
- DI CAGNO, R. et al. Exploitation of vegetables and fruits through lactic acid fermentation. **Food Microbiology**, v. 33, p. 1-10, 2013.
- DUARTE, F. N. D. et al. Potential prebiotic properties of cashew apple (*Anacardium occidentale* L.) agro-industrial byproduct on *Lactobacillus* species. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 97, p. 3712-3719, 2017.

- FORSTER-CARNEIRO T. et al. Biorefinery study of availability of agriculture residues and wastes for integrated biorefineries in Brazil. **Resources, Conservation and Recycling**, v. 77, p. 78-88, 2013.
- FURLANETO, F. P. B.; NASSER, M. D. Panorama da cultura da acerola no estado de São Paulo. **Pesquisa & Tecnologia**, v. 12, 2015.
- GAMMONE, M. A., RICCIONI, G., D'ORAZIO, N. Carotenoids: Potential allies of cardiovascular health? **Food & Function**, v. 59, p. 1-11, 2015
- GARCIA, ESTEFÂNIA F. et al. Identification of lactic acid bacteria in fruit pulp processing byproducts and potential probiotic properties of selected *Lactobacillus* strains. **Frontiers in Microbiology**, v. 7, p. 1371, 2016.
- GEBBERS, J.O. Atherosclerosis, cholesterol, nutrition, and statins – a critical review. **German Medical Science**, v. 5, p. 1-11, 2007.
- GOBBETTI, M., DI CAGNO, R., DE ANGELIS, M. Functional microorganisms for functional food quality. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**. v. 50, p. 716-727, 2010
- GONÇALVES, S. et al. Effect of in vitro gastrointestinal digestion on the total phenolic contents and antioxidant activity of wild Mediterranean edible plant extracts. **European Food Research and Technology**, v. 245, p. 753-762, 2019
- GUERRA, I.C.D. et al. The effects of composite coatings containing chitosan and *Mentha* (*piperita* L. or *x villosa* Huds) essential oil on postharvest mold occurrence and quality of table grape cv. Isabella. **Innovative Food Science and Emerging Technologies**, v. 34, p. 112–121, 2016.
- GÜLÇİN, I. Antioxidant activity of food constituents: An overview. **Archives of Toxicology**, v. 86, p. 345–391, 2012.
- GUEVARA-FIGUEROA, T. et al. Proximate composition, phenolic acids, and flavonoids characterization of commercial and wild nopal (*Opuntia* spp.). **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 23, p. 525-532, 2010.
- HAALAND, R. Porridge and Pot, Bread and Oven: Food Ways and Symbolism in Africa and the Near East from the Neolithic to the Present. **Cambridge Archaeological Journal**, v. 17, p. 165, 2007.
- HILBIG, J. et al. Influence of exopolysaccharide-producing lactic acid bacteria on the spreadability of fat-reduced raw fermented sausages (Teewurst). **Food Hydrocolloids**, v. 93, p. 422-431, 2019.
- HLADÍKOVÁ, Z. et al. Antimicrobial activity of selected lactic acid cocci and production of organic acids. **Acta Chimica Slovaca**, v. 5, p. 80-85, 2012.
- HUSSAIN, A. et a. Fermentation, a feasible strategy for enhancing bioactivity of herbal medicines. **Food Research International**, v. 81, p. 1-16, 2016.

- IANNITTI, T.; PALMIER B. Antioxidant therapy effectiveness: an up to Date. **European Review for Medical and Pharmacological Sciences**, v. 13, p. 245-278, 2009.
- JAESCHKE, D. P.; MARCZAK, L. D. F.; MERCALI, G. D. Evaluation of non-thermal effects of electricity on ascorbic acid and carotenoid degradation in acerola pulp during ohmic heating. **Food Chemistry**, v. 199, p. 128–134, 2016.
- KAPRASOB, R. et al. Beneficial lactic acid bacteria based bioprocessing of cashew apple juice for targeting antioxidant nutraceutical inhibitors as relevant antidotes to type 2 diabetes. **Process Biochemistry**, v. 82, p. 40-50, 2019.
- KATOUZIAN, I.; JAFARI, S.M. Nano-encapsulation as a promising approach for targeted delivery and controlled release of vitamins. **Trends in Food Science and Technology**, v. 53, p. 34–48, 2016.
- KHOSRAVI-LARGANI, M. A review on potential roles of vitamins in incidence, progression, and improvement of multiple sclerosis. **eNeurologicalSci**, v. 10, p. 37-44, 2018.
- KIM, D. O.; PADILLA-ZAKOUR, O. I.; GRIFFITHS, P. D. Flavonoids and antioxidant capacity of various cabbage genotypes at juvenile stage. **Journal of Food Science**, v. 69, p. C685–C689, 2016.
- KIM, S. B.; KIM, H.; KANG, S. *In vitro* anti-bacterial and anti-inflammatory activities of lactic acid bacteria-biotransformed mulberry (*Morus alba* Linnaeus) fruit extract against *Salmonella typhimurium*. **Food Control**, v. 106, p. 106758, 2019.
- KIM, H. G. et al. Flavonoid profiling in three citrus varieties native to the Republic of Korea using liquid chromatography coupled with tandem mass spectrometry: Contribution to overall antioxidant activity. **Biomedical Chromatography**, v. 26, p. 464–470, 2012.
- KLAENHAMMER, T. et al. Discovering lactic acid bacteria by genomics. *Antonie Van Leeuwenhoek*, **Netherlands**, v. 82, p. 29–58, 2002.
- KRIS-ETHERTON, P. M. et al. Bioactive compounds in foods: their role in the prevention of cardiovascular disease and cancer. **The American Journal of Medicine**, v. 113, p. 71-88, 2002.
- KULEY, E. et al. Combined effects of plant and cell-free extracts of lactic acid bacteria on biogenic amines and bacterial load of fermented sardine stored at $3\pm 1^\circ\text{C}$. **Food Bioscience**, v. 24, p. 127-136, 2018.
- LEBLANC, J. G. et al. Beneficial effects on host energy metabolism of short-chain fatty acids and vitamins produced by commensal and probiotic bacteria. **Microbial Cell Factories**, v. 16, p. 01–10, 2017.
- LEFFA, D. D. et al. Acerola (*Malpighia emarginata* DC.) juice intake protects against oxidative damage in mice fed by cafeteria diet. **Food Research International**, v. 77, p. 649-656, 2015.

- LEITE, A. V. et al. Antioxidant Potential of Rat Plasma by Administration of Freeze-dried Jaboticaba Peel (*Myrciaria jaboticaba* Vell Berg). **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 59, p. 2277–2283, 2011.
- LEROY F., DE VUYST L. Fermented food in the context of a healthy diet: how to produce novel functional foods? **Current Opinion in Clinical Nutrition & Metabolic Care**, v. 17 p. 574-581, 2014.
- LICHTENTHALER, H. K., BUSCHMANN, C. Chlorophylls and carotenoids: Measurement and characterization by UV-VIS spectroscopy. **Current Protocols in Food Analytical Chemistry**, v. 1, p. F4. 3.1-F4. 3.8, 2001.
- LIU, F.X. et al. Changes of tomato powder qualities during storage. **Powder Technology**, v. 204, p. 159–166, 2010.
- LIU, M. et al. Antioxidant and antiproliferative activities of raspberries. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 50, p. 2926–2930, 2002.
- MAIA, G. A.; FIGUEIREDO, R. W.; SANTOS, PHM. Técnica aumenta tempo de conservação da goiaba. **Revista Ciência e Tecnologia-FUNCAP**, v. 4, p. 11-12, 2002.
- MAIDANA, S. D. et al. Development of gluten-free breads started with chia and flaxseed sourdoughs fermented by selected lactic acid bacteria. **LWT - Food Science and Technology**, v. 125, p. 1-35, 2020.
- MARQUES, L. G. **Liofilização de frutas tropicais**. 2008. Tese (Doutorado em Engenharia Química/Pesquisa e Desenvolvimento de Processos Químicos) – Centro de Ciências Exatas e Tecnologia, Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 2008.
- MEDINA, M. B. Determination of the total phenolics in juices and superfruits by a novel chemical method. **Journal of Functional Foods**, v. 2, p. 79-87, 2011.
- MELÉNDEZ-MARTÍNEZ et al. The complex carotenoid pattern of orange juices from concentrate. **Food Chemistry**, v. 109, p. 546-553, 2008.
- MEZADRI, T. et al. 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.
- MIGLIO, C. et al. Effects of different cooking methods on nutritional and physicochemical characteristics of selected vegetables. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 56, p. 139–147, 2008.
- MICHALSKA, A.; ŁYSIAK, G. Przydatność do suszenia owoców śliw uprawianych w Polsce w aspekcie przemian związków bioaktywnych i tworzących się produktów reakcji Maillarda. **Żywność Nauka Technologia Jakość**, v. 21, p. 29-38, 2014.
- NAMBIAR, R. B., SELLAMUTHU, P. S., & PERUMAL, A. B. Development of milk chocolate supplemented with microencapsulated *Lactobacillus plantarum* HM47 and to determine the safety in a Swiss albino mice model. **Food Control**, v.94, p. 300-306, 2018

- NEMATOLLAHI, A. et al. Viability of probiotic bacteria and some chemical and sensory characteristics in cornelian cherry juice during cold storage. **Electronic Journal of Biotechnology**, v. 21, p. 49-53, 2016.
- NIETO-LOZANO, J. C. et al. The effect of the pediocin Pa-1 produced by *Pediococcus acidilactici* against *Listeria monocytogenes* and *Clostridium perfringens* in Spanish dry-fermented sausages and frankfurters. **Food Control**, v. 21, p. 679-685, 2010.
- NOGUEIRA, R. J. M. C. et al. Efeito do estágio de maturação dos frutos nas características físico-químicas de acerola. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 37, p. 463-470, 2002.
- OMEDI, J. O.; HUANG, W.; ZHENG, J. Effect of sourdough lactic acid bacteria fermentation on phenolic acid release and antifungal activity in pitaya fruit substrate. **LWT - Food Science and Technology**, v. 111, p. 309-317, 2019.
- PADILHA, C. V. et al. Rapid determination of flavonoids and phenolic acids in grape juices and wines by RP-HPLC/DAD: Method validation and characterization of commercial products of the new Brazilian varieties of grape. **Food Chemistry**, v. 228, p.106-115, 2017.
- PAZ, M. et al. Brazilian fruit pulps as functional foods and additives: 508 Evaluation of bioactive compounds. **Food Chemistry**, v. 172, p. 462-468, 2015.
- PENNINGTON, J. A. T.; FISHER, R. A. Food component profiles for fruit and vegetable subgroups. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 23, p. 411-418, 2010.
- PERES, C. M. et al. Review on fermented plant materials as carriers and sources of potentially probiotic lactic acid bacteria e with an emphasis on table olives. **Trends in Food Science & Technology**, v. 26, p. 31-42, 2012.
- PONTONIO, E. et. al. Brans from hull-less barley, emmer and pigmented wheat varieties: From by-products to bread nutritional improvers using selected lactic acid bacteria and xylanase. **International Journal of Food Microbiology**, v. 313, p. 1-12, 2020.
- POPKIN, B. M. Nutrition Transition and the Global Diabetes Epidemic. **Current Diabetes Reports**, v. 15, p. 64, 2015.
- POSSEMIERS, S. et al. Bacteria and chocolate: a successful combination for probiotic delivery. **International Journal of Food Microbiology**, v. 141, p. 97-103, 2010.
- REQUENA T. et al. Perspectives of the potential implications of wine polyphenols on human oral and gut microbiota **Trends in Food Science Technology**, v. 21, p. 332, 2010.
- ROCCHETTI, G. Edible nuts deliver polyphenols and their transformation products to the large intestine: An *in vitro* fermentation model combining targeted/untargeted metabolomics. **Food Research International**, v. 116, p. 786-794, 2019
- ROCKENBACH, I. I. et al. Phenolic compounds content and antioxidant activity in pomace from selected red grapes (*Vitis vinifera* L. and *Vitis labrusca* L.) widely produced in Brazil. **Food Chemistry**, v. 127, p. 174-179, 2011.

RODRÌGUEZ, H. et al. Food phenolics and lactic acid bacteria. **International Journal Food Microbiology**, v. 132, p. 79-90, 2009.

RUAS-MADIEDO, A. et al. Exopolysaccharides from lactic acid bacteria and bifidobacteria. In Y. H. Hui (Ed.), **Handbook of animal-based fermented food and beverage technology** (2nd ed.), LLC, 2012.

SAARELA, M. et al. Effect of the fermentation pH on the storage stability of *Lactobacillus rhamnosus* preparations and suitability of in vitro analyses of cell physiological functions to predict it. **Journal of Applied Microbiology**, v. 106, p. 1204-1212, 2009.

SAKANDAR, H.A.; KUBOW, S.; SADIQ, F.A. Isolation and in vitro probiotic characterization of fructophilic lactic acid bacteria from Chinese fruits and flowers. **LWT - Food Science and Technology**, v. 104, p. 70-75, 2019.

SARIBURUN, E. et al. Phenolic content and antioxidant activity of raspberry cultivars. **Journal Food Science**, v. 75, p. 328–335, 2010.

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, 2009.

SERAGENT, T., PIRONT, N., MEURICE, J. et al. Anti-inflammatory effects of dietary phenolic compounds in an *in vitro* model of inflamed human intestinal epithelium. **Chemico-Biological Interactions**, v. 188, p. 659-667, 2010.

SIRIWARDHANA, N. et al. Modulation of Adipose Tissue Inflammation by Bioactive Food Compounds. **The Journal of Nutritional Biochemistry**, v. 24, p. 613–623, 2013.

SHI, J. et al. Extraction of polyphenolics from plant material for functional foods – Engineering and technology. **Food Reviews International**, v. 21, p. 139–166, 2005.

SHORI, A. B. Influence of food matrix on the viability of probiotic bacteria: A review based on dairy and non-dairy beverages. **Food Bioscience**, v. 13, p. 1-8, 2016.

SNYDER, S.M., REBER, J.D., FREEMAN, B.L. et al. Controlling for sugar and ascorbic acid, a mixture of flavonoids matching navel oranges significantly increases human postprandial serum antioxidant capacity. **Nutrition Research**, v. 31, p. 519-526, 2011.

SOUZA, V. R. et al. Determination of bioactive compounds, antioxidant activity and chemical composition of Brazilian fruits of Cerrado. **Food Chemistry**, v. 134, p. 381 – 386, 2012.

STAN, S. D. et al. Bioactive food components and cancer risk reduction. **Journal of Cellular Biochemistry**, v. 104, p. 339–356, 2008.

SUN, Z. et al. Expanding the biotechnology potential of *lactobacilli* through comparative genomics of 213 strains and associated genera. **Nature Communications**, v. 6, p. 1–13, 2015

TANAKA, T., SHNIMIZU, M., MORIWAKI, H. Cancer chemoprevention by carotenoids. **Molecules**, v. 17, p. 3202-3242, 2012.

THOMAZ, A. M. A. U. **Avaliação das potencialidades biotecnológicas da semente de goiaba (*Psidium guajava* L.)**. 2014. 225 f. Tese (Doutorado em Biotecnologia) - Centro de Ciências, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2014.

TODOROV, S. D. et al. Technology and safety assessment for lactic acid bacteria isolated from traditional Bulgarian fermented meat product “lukanka”. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 48, p. 576-586, 2017.

TRIECHEL, M. Anuário brasileiro da fruticultura. Santa Cruz do Sul: Editora Gazeta Santa Cruz. p. 88, 2016.

VERÓN, H. E. et al. Isolation and selection of potential probiotic lactic acid bacteria from *Opuntia ficus-indica* fruits that grow in Northwest Argentina. **LWT - Food Science and Technology**, v. 84, p. 231-240, 2017.

VINCENT, H. K., BOURGUIGNON, C. M.; TAYLOR, A. G. Relationship of the dietary phytochemical index to weight gain, oxidative stress and inflammation in overweight young adults. *Journal of Human Nutrition and Dietetics: The Official Journal of the British Dietetic Association*, v. 23, p. 20–29, 2010.

VITALI, B.; MINERVINI, G.; RIZZELLO, C. G. et al. Novel probiotic candidates for humans isolated from raw fruits and vegetables. **Food Microbiology**, v. 31, p. 116-125, 2012.

VODNAR, D. C.; PAUCEAN, A.; DULF, F. V. et al. characterization of lactic acid formation and FTIR fingerprint of probiotic bacteria during fermentation processes. **Notulae Botanicae Horti Agrobotanici Cluj-Napoca**. v. 38, p. 109-113, 2010.

WANG, S. et al. How natural dietary antioxidants in fruits, vegetables and legumes promote vascular health. **Food Research International**, v. 44, p. 14–22, 2011.

WU, C., et al. Effects of lactic acid fermentation-based biotransformation on phenolic profiles, antioxidant capacity and flavor volatiles of apple juice. **LWT- Food Science and Technology**, v. 122, p. 1-22, 2020.

YEO, S. K.; EWE, J. A. Effect of fermentation on the phytochemical contents and antioxidant properties of plant foods. **Advances in Fermented Foods and Beverages**, v. 1, p. 107–122, 2015.

ZANATTA, C. L.; ZOTARELLI, M. F.; CLEMENTE, E. Peroxidase (POD) and polyphenoloxidase (PPO) in guava pulp (*Psidium guajava* R.). **Food Science and Technology**, v. 26, p. 705-708, 2006.

ZHENG, J.; MEENU, M.; XU, B. A systematic investigation on free phenolic acids and flavonoids profiles of commonly consumed edible flowers in China. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 172, p. 268-277, 2019.

APÊNDICES

Improvements in bioactive compounds and antioxidant activity of acerola (*Malpighia emarginata* D.C.) and guava (*Psidium guajava* L.) fruit industrial coproducts fermented with potentially probiotic lactobacilli

Running title: Fermentation of fruit coproduct with probiotics

Abstract

This study measured the effects of a submerged fermentation with a mixed inoculum with potentially probiotic *Lactobacillus* isolates (*L. casei* L-26, *L. fermentum* 56, *L. paracasei* 106 and *L. plantarum* 53) on their physicochemical characteristics, bioactive compounds and antioxidant activity of acerola (*Malpighia emarginata* D.C., ACE) and guava (*Psidium guajava* L., GUA) fruit industrial coproducts. Viable counts of probiotic lactobacilli in ACE and GUA after 120 h of fermentation were of ≥ 5.5 log CFU/mL. Fermentation caused an increase in luminosity and decrease in contrast of ACE and GUA. Contents of total soluble solids and pH values decreased in ACE and GUA during fermentation, in parallel with an increase in titratable acidity. Ascorbic acid contents decreased in ACE and increased in GUA during fermentation. Fermented ACE and GUA had increased contents of total flavonoids and total phenolics, which were linked to the higher antioxidant activities found in fermented ACE and GUA. Different phenolic compounds were found in ACE and GUA during fermentation. Contents of total flavonoids and total phenolics were correlated with antioxidant activity in fermented ACE and GUA. These results indicate that fermentation with probiotic lactobacilli could be a strategy to improve the contents of bioactive compounds and antioxidant activities of ACE and GUA.

Keywords: Fruit; agroindustrial waste; lactic acid bacteria; submerged fermentation; antioxidant activity; bioactivity.

1. Introduction

Brazil ranks the third position among the greatest tropical fruit producers in the world, following China and India (Moreira-Araújo et al., 2019). Acerola (*Malpighia emarginata* D.C.) and guava (*Psidium guajava* L.) are tropical fruit widely known for their high nutritional value and contents of bioactive compounds associated with a variety of health promoting properties (Alvarez-Suarez, 2018; Silva, Duarte & Barrozo, 2016). Significant part of acerola and guava fruit production has been destined for industrial processing, with the generation of large amounts of industrial coproducts, which are commonly disposed in the environment (Araújo et al., 2020; Duarte et al., 2017).

Coproducts generated during processing of tropical fruit have been commonly characterized as rich sources of bioactives, such as phenolic compounds, carotenoids and vitamins (da Silva et al., 2014), besides to have important antioxidant activities (Leite et al., 2011; Rufino et al., 2010). In addition to be used as a source of naturally occurring constituents, fruit processing coproducts could be exploited in bioprocess to enhance their bioactive properties, which could be an added-value destination for these materials (Sagar et al., 2018).

Fermentation with lactic acid bacteria (LAB) is a traditional method for food preservation (Kim, Kim & Kang, 2019; Xu et al., 2019), causing inhibition of undesired microorganisms and alterations in physicochemical and sensory characteristic of fermented matrices (Di Cagno et al., 2013). Fermentation with LAB has been reported to enable extraction of bioactive compounds in plant foods (Di Cagno et al., 2011; Özcan & Ekinici, 2016) and impact positively on their health promoting properties (Septembre-Malaterre, Remize, & Poucheret, 2018).

Lactobacillus has been the most studied LAB genus for selection of isolates with technological aptitudes for fruit and vegetables fermentation (Kapasob et al., 2017; Oh et al., 2017) and probiotic use (Argyri et al., 2013; de Albuquerque et al., 2018). Although there are some

reports about the effects of fermentation with LAB on bioactive compounds and antioxidant properties of plant-based foods (Campanella et al., 2017; Wu et al., 2020), investigations approaching the impacts of fermentation with probiotic lactobacilli on these parameters in tropical fruit processing coproducts are still scarce. In addition to their well-known beneficial effects on health (Costa et al., 2019; Cavalcante et al., 2019), probiotic lactobacilli could be biotechnological tools for bioconversion and production of functional foods/metabolites from fruit derived products (Campanella et al., 2017; Oh et al., 2017).

This study hypothesized that fermentation with selected probiotic *Lactobacillus* could induce positive changes in profile of bioactive compounds and antioxidant activities of acerola and guava processing coproducts. To test this hypothesis, the effects of a submerged fermentation with a mixed inoculum composed of four different potentially probiotic *Lactobacillus* isolates on physicochemical characteristics, contents of different bioactive compounds and antioxidant activities of acerola and guava processing coproducts were evaluated. The viable counts of *Lactobacillus* during submerged fermentation were also measured.

2. Material and methods

2.1 Preparation of acerola and guava fruit processing coproducts

Agroindustrial processing coproducts of acerola (*Malpighia emarginata* D.C.) and guava (*Psidium guayaba* L.) fruit were obtained from three different local fruit pulp processing companies (João Pessoa, Paraíba, Brazil). Samples (approximately 500 g) from four different processing batches from each industry were pooled (total of approximately six kg for each coproduct), packaged in heat-resistant plastic bags, autoclaved (121 °C, 1 atm, 15 min) and stored at -18 ± 2 °C in hermetically sealed polypropylene bags. Acerola and guava processing coproducts were used separately in experiments.

2.2 Microorganisms, inoculum preparation and submerged fermentation

Four different *Lactobacillus* isolates characterized as having properties compatible for probiotic use, namely *L. plantarum* 53, *L. paracasei* 106, *L. fermentum* 56 and *L. casei* L-26 (Duarte et al., 2017; Garcia et al., 2016), were used in submerged fermentation. Stock cultures were maintained in de Man, Rogosa and Sharpe (MRS) broth (HiMedia, Mumbai, India) with glycerol (150 g/L) at -18 ± 2 °C. For inoculum preparation, each isolate was cultured anaerobically (Anaerogen System Anaerogen, Oxoid, Wade Road, Basingstoke, UK) in MRS broth at 37 °C up to reaching the stationary growth phase (20–24 h), cell mass was collected by centrifugation ($4000 \times g$, 10 min, 4 °C), washed two times and collected again by centrifugation. Obtained cell pellets of each of the four *Lactobacillus* isolates were homogenized in sterile distilled water (final viable counts of approximately 10 log CFU/g) and were mixed in a rate of 1:1:1:1. Acerola (ACE) and guava processing coproducts (GUA) were directly incorporated (1:5, w/v) to the mixed suspension of *Lactobacillus* isolates in a sterile glass flask with a lid and subjected for fermentation under aerobiosis in a orbital shaker (Tecnal, Piracicaba, São Paulo, Brazil) under stirring (200 rpm) at 37 °C for 120 h. Final volume of fermentation media was of 500 mL.

2.3 Enumeration of viable counts of probiotic *Lactobacillus* during fermentation of ACE and GUA

The viable counts of probiotic *Lactobacillus* were determined at different time intervals (zero – just after homogenization, 8, 24, 48, 72 and 120 h of fermentation). A 1-mL aliquot of each fermentation medium was serially diluted (1:9, 10^{-1} – 10^{-6}) with sterile saline solution (NaCl 8.5 g/L) and 100- μ L aliquots of these dilutions were pour plated on MRS agar (HiMedia) using a microdrop inoculation technique (Herigstad, Hamilton & Heersink, 2001). After an incubation period of 48 h at 37 °C under anaerobic conditions (Anaerogen), the visible colonies were enumerated and results expressed as Log CFU/mL.

Physicochemical parameters, bioactive characterization and antioxidant activity of ACE and GUA were measured before fermentation and on pre-established fermentation time periods (zero – just after homogenization, 48, 72 120 h of fermentation).

2.4 Physicochemical characterization of ACE and GUA before and during fermentation

Physicochemical characterization of ACE and GUA was done with measurements of colour (L, chroma and hue^o) (CIE, 1986), pH, titratable acidity (TA) and total soluble solids (TSS) (AOAC, 2016). pH values were measured using a potentiometer with a combined glass electrode (Q400AS, Diadema, São Paulo, Brazil). TA was measured by titrating the samples with 0.1 N NaOH. TSS (°Brix, g/100 g of sample) was measured with a digital refractometer (HI 96801, Hanna Instruments, São Paulo, Brazil) at 25 ± 1 ° C.

2.5 Determination of ascorbic acid and carotenoid contents in ACE and GUA before and during fermentation

Ascorbic acid content was measured with a 2,6- dichlorophenol-indophenol dye solution and expressed as mg per 100 g of sample (mg/100 g) (AOAC, 2016). Total carotenoids content was measured according to a previously described method (Lichtenthaler & Buschmann, 2001). Absorption was measured at 470, 645 and 662 nm with a spectrophotometer (BEL Photonics, Piracicaba, São Paulo, Brazil). Total carotenoid content was expressed as mg per 100 g of sample (mg/100 g).

2.6 Determination of total flavonoid and total phenolic contents in ACE and GUA before and during fermentation

A 2-g aliquot of ACE and GUA was homogenized with methanol 80% for 10 min using a mini-Turrax apparatus (Technal, Piracicaba, São Paulo, Brazil), kept to rest for 24 h and filtered

with a 125 mm-filter paper (Whatman[®], GE Healthcare, Chicago, IL, USA). Total flavonoid content was measured with a previously described procedure (Guevara-Figueroa et al., 2010). A 0.5 mL-aliquot of the extract was added to 2 mL of distilled water and homogenized with 150 μ L of a 5% sodium nitrite. After 5 min, 150 μ L of 10% aluminum chloride solution was added and, after 6 min, 1 mL of 1 M sodium hydroxide solution and 1.2 mL of distilled water was added to the mixture. Sample absorbance was measured at 510 nm with a spectrophotometer (BEL Photonics) against a blank in the absence of extract. Content of total flavonoids was determined with a standard curve of catechin (Sigma-Aldrich, St. Louis, MA, USA) equivalents (CE). Results were expressed as mg catechin equivalents (CE) per 100 grams of sample (mg CE/100 g).

Total phenolic content was determined with Folin-Ciocalteu method. A 250 μ L-aliquot of the extract was homogenized with 1250 μ L of 10% Folin-Ciocalteu reagent, stirred with a Vortex mixer (Quimis, Diadema, São Paulo, Brazil), stored at room temperature (25 ± 0.5 ° C) under dark for 6 min, added of a 1 mL-aliquot of 7.5% sodium carbonate solution and placed in a water-bath (Raypa, Barcelona, Spain) at 50 ± 0.5 ° C for 5 min. Absorbance was measured at 765 nm with a spectrophotometer (BEL Photonics). A blank was performed with absence of extract to reset spectrophotometer. Total phenolic content was determined with a standard curve prepared with gallic acid (Sigma-Aldrich). Results were expressed as mg equivalent of gallic acid (EGA) per 100 grams of sample (mg EGA/100g) (Liu et al., 2002).

2.7 Determination of phenolic compounds in ACE and GUA before and during fermentation

Five-g of ACE and GUA were homogenized with 5 mL of 80% methanol (Sigma Aldrich), centrifuged ($9000 \times g$, 15 min, 4 ° C) and filtered with a 0.45 μ m-filter (Millex Millipore, Barueri, SP, Brazil). Individual phenolic compounds were determined with high performance liquid chromatograph, with gradient adaptations and runtime to quantify different phenolic classes, using an Agilent 1260 Infinity System LC liquid chromatograph (Agilent Technologies,

Santa Clara, CA, USA) coupled to a diode array detector (DAD) (G1315D). The column was a Zorbax Eclipse Plus RP-C18 (100 × 4.6 mm, 3.5 μm) and pre-column was a Zorbax C18 (12.6 × 4.6 mm, 5 μm) (Agilent). Oven temperature was 35 °C and injection volume was 20 μL diluted in phase A and filtered with a 0.45 μm-filter (Millex Millipore). Solvent flow was 0.8 mL/min; new gradient used in separation was zero to 5 min: 5% B; 5 to 14 min: 23% B; 14 to 30 min: 50% B; 30-33 min: 80% B, where solvent A was a solution of phosphoric acid (0.1 M, pH = 2.0) and solvent B was acidified methanol with 0.5% H₃PO₄. Data were processed with OpenLAB CDS ChemStation Edition software (Agilent Technologies). Detection of phenolic compounds was done at 220, 280, 320, 360 and 520 nm. Identification and quantification were done by comparison with external standards (Sigma-Aldrich). Results were expressed as mg of phenolic compound for 100 g of sample (mg/100 g) (Padilha et al., 2017).

2.8 Evaluation of antioxidant activities in ACE and GUA before and during fermentation

The FRAP and ABTS methods were used to evaluate antioxidant activities of ACE and GUA. A 2 g-sample of ACE and GUA were homogenized with 10 mL of 80% methanol for 10 min with a mini-Turrax apparatus (Technal), kept to rest for 24 h and filtered with a 125 mm-filter (Whatman®). The ability of these extracts to reduce iron was measured with FRAP (ferric reducing ability of plasma) method according to a previously described procedure (Rockenbach et al., 2011). FRAP reagent was prepared with 3 mol/L of acetate buffer (pH 3.6) + 10 mM/L of TPTZ (2,4,6-tris (2-pyridyl)-s-triazine) in a 40 mM/L HCl solution + 20 mM FeCl₃. A 200 mL-aliquot of the extract was added to 1800 μL of FRAP solution, stirred with a Vortex mixer (Quimis) for 30 s and placed in a water bath for 30 min at 37 ° C. Absorbance was measured at 593 nm with a spectrophotometer (BEL Photonics). The standard curve was created with Trolox 1 mM and results were expressed in μM Trolox per g of sample (μM Trolox/g).

The ability of extract to capture ABTS^{•+} cation (2,2-azino-bis (3-ethylbenzothiazoline)-6-sulfonic acid) was measured with ABTS method. ABTS reagent, which was prepared by mixing 5 mL of 7 mM ABTS with 88 µL of 140 mM potassium persulfate (final concentration of 2.45 mM) (Sariburun et al., 2010) and ABTS^{•+} was formed after resting ABTS reagent for 12 – 16 h at room temperature (25 ± 0.5 ° C) under the dark. ABTS^{•+} solution was diluted with distilled water to an absorbance value of 0.800 - 0.900 at 734 nm. Absorbance of reaction mixture (600 µL) with 100 µL of extract and 500 µL of ABTS^{•+} solution was measured at 734 nm in a spectrophotometer (BEL Photonics). A control solution formed by 100 µL-aliquot of extracting solvent + 500 µL of ABTS radical was prepared. White solution was the extracting solvent for each extract used to reset the spectrophotometer. Trolox was used as a reference and results were expressed in µmol trolox equivalent antioxidant capacity per gram of sample (µmol TEAC/g).

2.9 Statistical analysis

Experiments were done in triplicate in two independent occasions and results were expressed as average \pm standard deviation. Data were submitted to Student's *t* test or analysis of variance (ANOVA) followed by Tukey's test using $p \leq 0.05$. These analyses were done with computational software GraphPad Prism 6.0 (GraphPad Software Inc., San Diego, CA, USA). Correlations were calculated with Pearson's correlation coefficient (*r*). A principal component analysis (PCA) was carried out to evaluate the correlation matrix among probiotic *Lactobacillus* viable counts, total carotenoids, total flavonoids, vitamin C, total phenolics, phenolic profile and antioxidant activity during fermentation. XLSTAT software version 2019.2.2.59614 (Addinsoft 2019; XLSTAT statistical and data analysis solution, Boston, MA, USA) was used to run correlations analysis and PCA.

3. Results and discussion

3.1 Physicochemical characteristics and bioactive compounds of ACE and GUA before fermentation

Values of measured physicochemical parameters of ACE and GUA before fermentation are presented in Table 1. ACE and GUA had low TSS content (0.85 ± 0.07 - 1.50 ± 0.01 g/100 g) and acidic pH (3.84 ± 0.07 - 4.93 ± 0.06). ACE had higher TA (3.40 ± 0.01 g/100 g) when compared to GUA (1.96 ± 0.01 g/100 g) ($p \leq 0.05$). ACE and GUA had low luminosity (41.22 ± 0.66 - 44.35 ± 0.82), with a more saturated red hue, mainly for ACE ($p \leq 0.05$).

A range of bioactive compounds were found in ACE and GUA before fermentation, including ascorbic acid, carotenoids, flavonoids and phenolics. ACE and GUA showed antioxidant activities when measured with ABTS or FRAP method. ACE had higher contents of ascorbic acid (30.13 ± 0.03 mg/100 g), total flavonoids (187.80 ± 11.31 mg EC/100 g) and total phenolics (4886.79 ± 66.71 mg EGA/100 g), as well as higher antioxidant activities (FRAP method: 2348.65 ± 11.21 μ mol TEAC/g; ABTS method: 7.90 ± 0.14 μ mol TEAC/g) when compared to GUA ($p \leq 0.05$). Contents of carotenoids were similar ($p > 0.05$) in ACE and GUA.

3.2 Viable counts of probiotic *Lactobacillus* in ACE and GUA during fermentation

Viable counts of probiotic *Lactobacillus* spp. in ACE and GUA during fermentation are shown in Fig. 1. Viable counts of probiotic *Lactobacillus* spp. in ACE or GUA were of >8 log CFU/mL on time zero of fermentation, which were reduced ($p \leq 0.05$) after 24 h of fermentation (≥ 6.5 log CFU/mL). Although with an overall reduction of viable counts during fermentation, high viable counts of probiotic *Lactobacillus* spp. (≥ 5.5 log CFU/mL) were found in ACE or GUA at the end of the 120 h-fermentation.

ACE and GUA are source of simple sugars and nondigestible carbohydrates (*e.g.*, dietary fibers and fructo-oligosaccharides) (Batista et al., 2018), which could be substrates for inoculated *Lactobacillus* to keep high viable counts during fermentation. Our results are similar to the find-

ing by Kaprasob et al. (2017), who at the end of the fermentation process (48 h), obtained a population of lactic acid bacteria (*Lactobacillus casei* and *L. plantarum*) in cashew juice of approximately 6.0 log CFU/mL.

Different antagonistic metabolites, including organic acids, carbon dioxide, ethanol, hydrogen peroxide, diacetyl and bacteriocins, are typically produced during fermentation (Hwan-ghem et al., 2011; Soria & Audisio, 2014), which could result in unfavorable conditions not for only spoilage or pathogenic microorganisms, but also LAB. The increased acidity of ACE or GUA during fermentation could be linked with the reduction of viable counts of probiotic *Lactobacillus*, which occurred mostly in early stage of fermentation.

3.3 Physicochemical characteristics and instrumental color of ACE and GUA during fermentation

Values of TSS, TA and pH of ACE and GUA during fermentation are shown in Fig. 2. A reduction in TSS ($2.05 \pm 0.07 - 0.70 \pm 0.01$ g/100 g) and pH (3.61 ± 0.03 to 2.66 ± 0.01) was found overall during the measured fermentation period, with a parallel increase in TA (1.67 ± 0.34 to 6.30 ± 0.13 g/100 g) ($p \leq 0.05$). Fermented GUA had lower TSS ($p \leq 0.05$) when compared to ACE after 120 h. Biochemical alterations are commonly found in fruit coproducts during fermentation, including increase in TA and decrease in pH and TSS (Campanella et al., 2017). Substrate fermentation by LAB cause decrease in sugar contents, which are primarily used for bacterial growth and conversion into organic acids (Kwaw et al., 2018; Maldonado et al., 2017).

Instrumental colour parameters of ACE and GUA during fermentation are shown in Table 2. L values increased ($p \leq 0.05$) during fermentation, indicating the longer the fermentation period the lighter/brighter the fermented coproduct became. Chroma values were lower ($p \leq 0.05$) for GUA when compared to ACE after 120 h of fermentation. An increase in °Hue values

was found in ACE and GUA during fermentation; however, °Hue values were higher ($p \leq 0.05$) for GUA when compared to ACE after 120 h of fermentation. Hue angle (hue°) is a qualitative attribute that represents the hue of the colors (Pathare et al., 2013). Therefore, an increase in luminosity and a decrease in contrast (more neutral color) was found for ACE and GUA during fermentation ($p \leq 0.05$), indicating a change in color from red to yellowish red of fermented coproducts. Isomerization and oxidation of carotenoids through the production of hydrogen peroxide could change color of fruit products during fermentation (Baker & Günter, 2004), which would be possibly linked to change in instrumental color parameters found for ACE and GUA.

3.4 Contents of bioactive compounds and antioxidant activity of ACE and GUA during fermentation

Contents of measured bioactive compounds in ACE and GUA during fermentation are shown in Table 2. A clear but not similar effect of fermentation on the contents of measured bioactive compounds in ACE and GUA was found. Ascorbic acid content decreased in ACE, while increased in GUA during fermentation ($p \leq 0.05$). ACE had decreased ascorbic acid content during fermentation even having low pH, indicating that other factors could be involved in reported ascorbic acid decrease (Silveira et al., 2019).

Acidic pH values commonly inhibit ascorbic acid autoxidation when redox potential fluctuates (Filannino et al., 2016; Silveira et al., 2019). GUA had a more acidic pH after 120 h of fermentation when compared to ACE, which could contribute to the increased ascorbic acid content found in GUA during fermentation, indicating a possible preservation of ascorbic acid from oxidative processes. A 120 h-fermentation of okara seed resulted in decreased ascorbic acid contents over time, being reported that decreased ascorbic acid content could be due to an increased activity of ascorbate oxidase enzyme produced by microorganisms during fermentation (Adetuyi, Osagie & Adekunle, 2008).

Although selected microbial isolates have shown ability to produce carotenoid through fermentation process (Hernández-Almanza et al., 2014), the contents of total carotenoids did not alter ($p > 0.05$) in ACE and GUA during the 120 h-fermentation with probiotic *Lactobacillus*. Contents of total flavonoids and total phenolics were increased in ACE and GUA during fermentation. However, contents of total flavonoids and total phenolics were higher ($p \leq 0.05$) in ACE when compared to GUA regardless of the measured fermentation time. Fermentation with selected LAB isolates could help to release flavonoids in fruit and vegetables (Oh et al., 2017), besides to cause conversion of simple phenolics and depolymerization of high molecular weight phenolics (Hur et al., 2014). Previous studies have reported increased total phenolic contents in fruit juices fermented with LAB, including *Lactobacillus* species (Wu et al., 2020; Kaprasob et al., 2017).

Antioxidant activities of ACE and GUA were increased ($p \leq 0.05$) during fermentation when measured with either FRAP or ABTS method. Different phenolic compounds were identified in ACE and GUA during fermentation (Table 3). Specifically, kaempferol, myricetin, quercetin, chlorogenic acid, epicatechin and procyanidin B1 were found in ACE and/or GUA in most of the measured fermentation periods, which could have contributed to the increased antioxidant activities found in fermented coproducts.

Results of PCA showed similarities between fermented ACE and GUA in relation to viable counts of probiotic *Lactobacillus* and contents of ascorbic acid, total carotenoids, total flavonoids and total phenolics and antioxidant activity (Fig. 3). Data variance was explained by 56.34% for PC1 and 21.09% for PC2. Strongest negative correlation with PC2 was found for viable counts of probiotic *Lactobacillus* and weakest positive correlation with PC2 was found for total carotenoids. An average positive correlation for ascorbic acid, a strong positive correlation for total flavonoids and antioxidant activity measured with ABTS method, while a very strong

positive correlation for total phenolics and antioxidant activity measured with FRAP with PC1 was found.

ACE had a stronger positive correlation with PC1 regardless of the fermentation period due to its higher content of total flavonoids and total phenolics. Contents of measured bioactive compounds and size of antioxidant activity determined with FRAP and ABTS method clearly separated fermented ACE and GUA. As can be seen in PCA, the content of total flavonoids ($r = 0.88$) and phenolics ($r = 0.96$) were strongly and positively correlated with antioxidant activity measured with FRAP method, while content of total phenolics ($r = 0.84$) was strongly and positively correlated with antioxidant activity measured with ABTS method. These results could explain the higher antioxidant activity found for fermented ACE, which had higher contents of total flavonoids and total phenolics than GUA during fermentation. An early study reported that fermentation with *L. plantarum* 12A and *L. paracasei* 14A had not effect on total phenolic contents and antioxidant activity of a grape processing coproduct (Campanella et al., 2017), indicating that influence on phenolic profile and antioxidant activity could be related to the type of substrate and/or *Lactobacillus* isolate used in fermentation.

Secondary metabolites produced during fermentation of plant foods by probiotic lactobacilli are of interest in a health promotion perspective (Kwaw et al., 2018). These secondary metabolites commonly exert high antioxidant effects because of their free radical scavenging activities and protection from lipid oxidation (Alvarez-Suarez et al., 2018; Silveira et al., 2019). Probiotics induce beneficial alterations on composition and metabolic activity of intestinal microbiota (Cavalcante et al., 2019), being reported that combined consume of probiotics and plant bioactive compounds could mutually enhanced their positive effects on human health (de Souza et al., 2018). The results of this study showing high viable counts of a mixed inoculum with different potentially probiotic *Lactobacillus* isolates together with an improved profile of bioactive compounds and increased antioxidant activities in fermented ACE and GUA are noteworthy, which

could indicate a potential boosting of the potential health-related functionalities in these materials with the use of a simple biotechnological process, creating new opportunities for the production of functional foods and/or dietary supplements.

4. Conclusions

Fermentation of ACE and GUA with a mixed inoculum of potentially probiotic *L. plantarum*, *L. paracasei*, *L. casei* and *L. fermentum* isolates affected the physicochemical characteristics of these agroindustrial coproducts, besides to improve their contents of bioactive compounds and antioxidant activities. Potentially probiotic *Lactobacillus* isolates maintained high viable counts during the measured fermentation period. Increased contents of total flavonoids and total phenolics and presence of different phenolic compounds could be associated with increased antioxidant activity of fermented ACE and GUA. These results indicate that fermentation of ACE and GUA by probiotic lactobacilli could be a good alternative to enhance their bioactive compound profile and, consequently, their potential health-related properties. Further investigations could optimize fermentation conditions and measure their impacts on physicochemical characteristics, profile of bioactive compounds and bioactivities of ACE and GUA.

Acknowledgment

Authors thank the CAPES (Brazil) for partial funding of this research (Finance code 001).

Conflict of interest

The authors declare no conflict of interest.

References

- Adetuyi, F.O., Osagie, A.U., & Adekunle, A.T. (2008). Antioxidant Degradation in six indigenous okra (*Abelmoschus esculentus* (L) Moench) varieties during storage in Nigeria. *Journal of Food Technology*, 6, 227-230.
- Alvarez-Suarez, J. M., Giampieri, F., Gasparrini, M., Mazzoni, L., Forbes-Hernández, T. Y., Afrin, S., & Battino, M. (2018). Guava (*Psidium guajava* L. cv. Red Suprema) crude extract protect human dermal fibroblasts against cytotoxic damage mediated by oxidative stress. *Plant Foods for Human Nutrition*, 73, 18-24. <https://doi.org/10.1007/s11130-018-0657-2>
- Araújo, C. M., Sampaio, K. B., Menezes, F. N. D. D., Almeida, E. T. D. C., Lima, M. D. S., Viera, V. B., ...de Oliveira, M. E. G. (2020). Protective effects of tropical fruit processing coproducts on probiotic *Lactobacillus* strains during freeze-drying and storage. *Microorganisms*, 8, 96. <https://doi.org/10.3390/microorganisms8010096>
- Argyri, A. A., Zoumpopoulou, G., Karatzas, K. A., Tsakalidou, E., Nychas, G. J., Panagou, E. Z., & Tassou, C. C. (2013). Selection of potential probiotic lactic acid bacteria from fermented olives by in vitro tests. *Food Microbiology*, 33, 282–291. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2012.10.005>
- Association of Official Analytical Chemists – AOAC. (2016). Official methods of analysis of A.O.A.C. *International, United States, 20th ed.*
- Baker, R. & Günter C. (2004). The role of carotenoids in consumer choice and likely benefits from their inclusion into products for human consumption. *Trends in Food Science and Technology*, 15, 484-488. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2004.04.0094>
- Batista, K. S., Alves, A. F., dos Santos Lima, M., da Silva, L. A., Lins, P. P., de Sousa Gomes, J. A., ..., & da Conceição, M. L. (2018). Beneficial effects of consumption of acerola, cashew or guava processing by-products on intestinal health and lipid metabolism in dyslipidaemic female Wistar rats. *British Journal Nutrition*, 119, 30–41. <https://doi.org/10.1017/S0007114517003282>
- Campanella, D., Rizzello, C. G., Fasciano, C., Gambacorta, G., Pinto, D., Marzani, B., ..., & Gobbetti, M. (2017). Exploitation of grape marc as functional substrate for lactic acid bacteria and bifidobacteria growth and enhanced antioxidant activity. *Food Microbiology*, 65, 25-35. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2017.01.019>
- Casarotti, S. N., Borgonovi, T. F., Batista, C. L., & Penna, A. L. B. (2018). Guava, orange and passion fruit by-products: Characterization and its impacts on kinetics of acidification and properties of probiotic fermented products. *LWT - Food Science and Technology*, 98, 69-76. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2018.08.010>
- Cavalcante, R. G., de Albuquerque, T. M., de Luna Freire, M. O., Ferreira, G. A., dos Santos, L. A. C., Magnani, M., ..., & de Brito Alves, J. L. (2019). The probiotic *Lactobacillus fermentum* 296 attenuates cardiometabolic disorders in high fat diet-treated rats. *Nutrition, Metabolism and Cardiovascular Diseases*, 29, 1408-1417. <https://doi.org/10.1016/j.numecd.2019.08.003>
- CIE, COMMISSION INTERNATIONALE DE L'ÉCLAIRAGE. *Colourimetry*. Vienna: CIE publication, 2 ed., 1986.
- Costa, W. K. A., Brandão, L. R., Martino, M. E., Garcia, E. F., Alves, A. F., de Souza, E. L., ..., & Magnani, M. (2019). Qualification of tropical fruit-derived *Lactobacillus plantarum* strains as potential probiotics acting on blood glucose and total cholesterol levels in Wistar rats. *Food Research International*, 124, 109-117. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2018.08.035>
- Da Silva, L. M. R., De Figueiredo, E. A. T., Ricardo, N. M. P. S., Vieira, I. G. P., De Figueiredo, R. W., Brasil, I. M., & Gomes, C. L. (2014). Quantification of bioactive compounds

- in pulps and by-products of tropical fruits from Brazil. *Food Chemistry*, *143*, 398-404. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2013.08.001>
- de Albuquerque, T. M. R., Garcia, E. F., de Oliveira Araújo, A., Magnani, M., Saarela, M., & de Souza, E. L. (2018). In vitro characterization of *Lactobacillus* strains isolated from fruit processing by-products as potential probiotics. *Probiotics and Antimicrobial Proteins*, *10*, 704-716. <https://doi.org/10.1007/s12602-017-9318-2>
- de Souza, E. L., de Albuquerque, T. M. R., dos Santos, A. S., Massa, N. M. L., & de Brito Alves, J. L. (2018). Potential interactions among phenolic compounds and probiotics for mutual boosting of their health-promoting properties and food functionalities—a review. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, *59*, 1645-1659. <https://doi.org/10.1080/10408398.2018.1425285>
- Di Cagno, R., Coda, R., De Angelis, M., & Gobbetti, M. (2013). Exploitation of vegetables and fruits through lactic acid fermentation. *Food Microbiology*, *33*, 1-10. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2012.09.003>
- Di Cagno, R., Minervini, G., Rizzello, C.G., De Angelis, M., & Gobbetti, M. (2011). Effect of lactic acid fermentation on antioxidant, texture, color and sensory properties of red and green smoothies. *Food Microbiology*, *28*, 1062-1071. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2011.02.011>
- Duarte, F. N. D., Rodrigues, J. B., da Costa Lima, M., Lima, M. D. S., Pacheco, M. T. B., Pintado, M. M. E., & de Souza, E. L. (2017). Potential prebiotic properties of cashew apple (*Anacardium occidentale* L.) agro-industrial byproduct on *Lactobacillus* species. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, *97*, 3712-3719. <https://doi.org/10.1002/jsfa.8232>
- Filannino, P., Cavoski, I., Thlien, N., Vincentini, O., De Angelis, M., Silano, M., ..., & Di Cagno, R. (2016). Lactic acid fermentation of cactus cladodes (*Opuntia ficus-indica* L.) generates flavonoid derivatives with antioxidant and anti-inflammatory properties. *PLoS One*, *11*, 1-22. <http://doi.org/10.1371/journal.pone.0152575>
- Garcia, E. F., Luciano, W. A., Xavier, D. E., Costa, W. C. A., Oliveira, K. S., Franco, O. L., ..., & de Souza, E. L. (2016). Identification of lactic acid bacteria in fruit pulp processing by products and potential probiotic properties of selected *Lactobacillus* strains. *Frontiers in Microbiology*, *7*, 1–11. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.01371>
- Guevara-Figueroa, T., Jiménez-Islas, H., Reyes-Escogido, M. L., Mortensen, A. G., Laursen, B. B., Lin, L. W., ..., & de la Rosa, A. P. B. (2010). Proximate composition, phenolic acids, and flavonoids characterization of commercial and wild nopal (*Opuntia* spp.). *Journal of Food Composition and Analysis*, *23*, 525-532. <https://doi.org/10.1016/j.jfca.2009.12.003>
- Herigstad, B., Hamilton, M., & Heersink, J. (2001). How to optimize the drop plate method for enumerating bacteria. *Journal Microbiology Methods*, *44*, 121–129. [https://doi.org/10.1016/S0167-7012\(00\)00241-4](https://doi.org/10.1016/S0167-7012(00)00241-4)
- Hernández-Almanza, A., Montañez-Sáenz, J., Martínez-Ávila, C., Rodríguez-Herrera, R., & Aguilar, C. N. (2014). Carotenoid production by *Rhodotorula glutinis* YB-252 in solid-state fermentation. *Food Bioscience*, *7*, 31-36. <https://doi.org/10.1016/j.fbio.2014.04.001>
- Hur, S. J., Lee, S. Y., Kim, Y. C., Choi, I., & Kim, G. B. (2014). Effect of fermentation on the antioxidant activity in plant-based foods. *Food Chemistry*, *160*, 346-356. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2014.03.112>
- Kaprasob, R., Kerdchoechuen, O., Laohakunjit, N., Sarkar, D., & Shetty, K. (2017). Fermentation-based biotransformation of bioactive phenolics and volatile compounds from cashew apple juice by select lactic acid bacteria. *Process Biochemistry*, *59*, 141-149. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2017.05.019>

- Kim, B. S., Kim, H., & Kang, S. S. (2019). In vitro anti-bacterial and anti-inflammatory activities of lactic acid bacteria-biotransformed mulberry (*Morus alba* Linn.) fruit extract against *Salmonella typhimurium*. *Food Control*, *106*, 1-8. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2019.106758>
- Kwaw, E., Ma, Y., Tchabo, W., Apaliya, M. T., Wu, M., Sackey, A. S., ..., & Tahir, H. E. (2018). Effect of *Lactobacillus* strains on phenolic profile, color attributes and antioxidant activities of lactic-acid-fermented mulberry juice. *Food Chemistry*, *250*, 148-154. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2018.01.009>
- Leite, A. V., Malta, L. G., Riccio, M. F., Eberlin, M. N., Pastore, G. M., & Marostica Junior, M. R. (2011). Antioxidant potential of rat plasma by administration of freeze-dried jaboticaba peel (*Myrciaria jaboticaba* Vell Berg). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *59*, 2277-2283. <https://doi.org/10.1021/jf103181x>
- Lichtenthaler, H. K., & Buschmann, C. (2001). Chlorophylls and carotenoids: Measurement and characterization by UV-VIS spectroscopy. *Current Protocols in Food Analytical Chemistry*, *1*, F4.3.1 – F4.3.8. <https://doi.org/10.1002/0471142913.faf0403s01>
- Liu, M.; Li, X.Q.; Weber, C.; Lee, C.Y.; Brown, J., & Liu, R.H. (2002). Antioxidant and anti-proliferative activities of raspberries. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *50*, 2926–2930. <https://doi.org/10.1021/jf0111209>
- Maldonado, R. R., da Costa Araújo, L., da Silva Dariva, L. C., Rebac, K. N., de Souza Pinto, I. A., Prado, J. P. R., ..., & Aguiar-Oliveira, E. (2017). Potential application of four types of tropical fruits in lactic fermentation. *LWT – Food Science and Technology*, *86*, 254-260. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2017.08.005>
- Moreira-Araújo, R. S. D. R., Barros, N. V. D. A., Porto, R. G. C. L., Brandão, A. D. C. A. S., Lima, A. D., & Fett, R. (2019). Bioactive compounds and antioxidant activity three fruit species from the Brazilian Cerrado. *Revista Brasileira de Fruticultura*, *41*, 1-8. <https://doi.org/10.1590/0100-29452019011>
- Oh, B. T., Jeong, S. Y., Velmurugan, P., Park, J. H., & Jeong, D. Y. (2017). Probiotic-mediated blueberry (*Vaccinium corymbosum* L.) fruit fermentation to yield functionalized products for augmented antibacterial and antioxidant activity. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, *124*, 542-550. <https://doi.org/10.1016/j.jbiosc.2017.05.011>
- Özcan, E., & Ekinçi F. (2016). Mechanisms underlying the effects of lactic acid bacteria (LAB) on phenolic compounds. *International Journal of Food and Biosystems*, *1*, 7-15.
- Padilha, C. V. S., Miskinis, G. A., de Souza, M. E. A. O., Pereira, G. E., de Oliveira, D., Bordinon-Luiz, M. T., & dos Santos Lima, M. (2017). Rapid determination of flavonoids and phenolic acids in grape juices and wines by RP-HPLC/DAD: Method validation and characterization of commercial products of the new Brazilian varieties of grape. *Food Chemistry*, *228*, 106-115. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2017.01.137>
- Pathare, P. B., Opara, U. L., & Al-Said, F. A. (2013). Colour Measurement and Analysis in Fresh and Processed Foods: A Review. *Food Bioprocess Technology*, *6*, 36-60. <https://doi.org/10.1007/s11947-012-0867-9>
- Rockenbach, I. I., Rodrigues, E., Gonzaga, L. V., Caliari, V., Genovese, M. I., Gonçalves, A. E. D. S. S., & Fett, R. (2011). Phenolic compounds content and antioxidant activity in pomace from selected red grapes (*Vitis vinifera* L. and *Vitis labrusca* L.) widely produced in Brazil. *Food Chemistry*, *127*, 174-179. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2010.12.137>
- Rufino, M. S. M., Alves, R. E., de Brito, E. S., Pérez-Jiménez, J., Saura-Calixto, F., & Mancini-Filho, J. (2010). Bioactive compounds and antioxidant capacities of 18 non-traditional tropical fruits from Brazil. *Food Chemistry*, *121*, 996-1002. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2010.01.037>
- Sagar, N. A., Pareek, S., Sharma, S., Yahia, E. M., & Lobo, M. G. (2018). Fruit and vegetable waste: Bioactive compounds, their extraction, and possible utilization. *Comprehensive*

- Reviews in Food Science and Food Safety*, 17, 512-531. <https://doi.org/10.1111/1541-4337.12330>
- Sariburun, E.; Sahin, S.; Demir, C.; Turkben, C. & Uylaser, V. (2010). Phenolic content and antioxidant activity of raspberry cultivars. *Journal Food Science*, 75, 328–335. <https://doi.org/10.1111/j.1750-3841.2010.01571.x>
- Septembre-Malaterre, A., Remize, F., & Poucheret, P. (2018). Fruits and vegetables, as a source of nutritional compounds and phytochemicals: Changes in bioactive compounds during lactic fermentation. *Food Research International*, 104, 86-99. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2017.09.031>
- Silva, P. B., Duarte, C. R., & Barrozo, M. A. (2016). Dehydration of acerola (*Malpighia emarginata* DC) residue in a new designed rotary dryer: Effect of process variables on main bioactive compounds. *Food and Bioproducts Processing*, 98, 62-70. <https://doi.org/10.1016/j.fbp.2015.12.008>
- Silveira, M. R., Coutinho, N. M., Esmerino, E. A., Moraes, J., Fernandes, L. M., Pimentel, T. C., ..., & Borges, F. O. (2019). Guava-flavored whey beverage processed by cold plasma technology: Bioactive compounds, fatty acid profile and volatile compounds. *Food Chemistry*, 279, 120-127. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2018.11.128>
- Xu, X., Bao, Y., Wu, B., Lao, F., Hu, X., & Wu, J. (2019). Chemical analysis and flavor properties of blended orange, carrot, apple and Chinese jujube juice fermented by selenium-enriched probiotics. *Food Chemistry*, 289, 250-258. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2019.03.068>
- Wu, C., Li, T., Qi, J., Jiang, T., Xu, H., & Lei, H. (2020). Effects of lactic acid fermentation-based biotransformation on phenolic profiles, antioxidant capacity and flavor volatiles of apple juice. *LWT - Food Science and Technology*, 122, 1-21. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2020.109064>

Figure captions

Figure 1. Viable counts (log CFU/mL) of potentially probiotic *Lactobacillus* in acerola (ACE, ■) and guava coproduct (GUA, ▲) during the 120 h-fermentation.

Figure 2. Values of total soluble solids (a), titratable acidity (b) and pH (c) in acerola (ACE, ■) and guava coproduct (GUA, ▲) during a 120 h-fermentation with potentially probiotic *Lactobacillus*.

Figure 3. Principal component analysis (PCA) of the viable counts of potentially probiotic *Lactobacillus*, contents of ascorbic acid, total carotenoids, total flavonoids, total phenolics and antioxidant activity (FRAP and ABTS) of fermented acerola and guava coproducts at zero, 48, 72 and 120 h. A: acerola coproduct fermented with probiotic *Lactobacillus*; G: guava coproduct fermented with probiotic *Lactobacillus*.

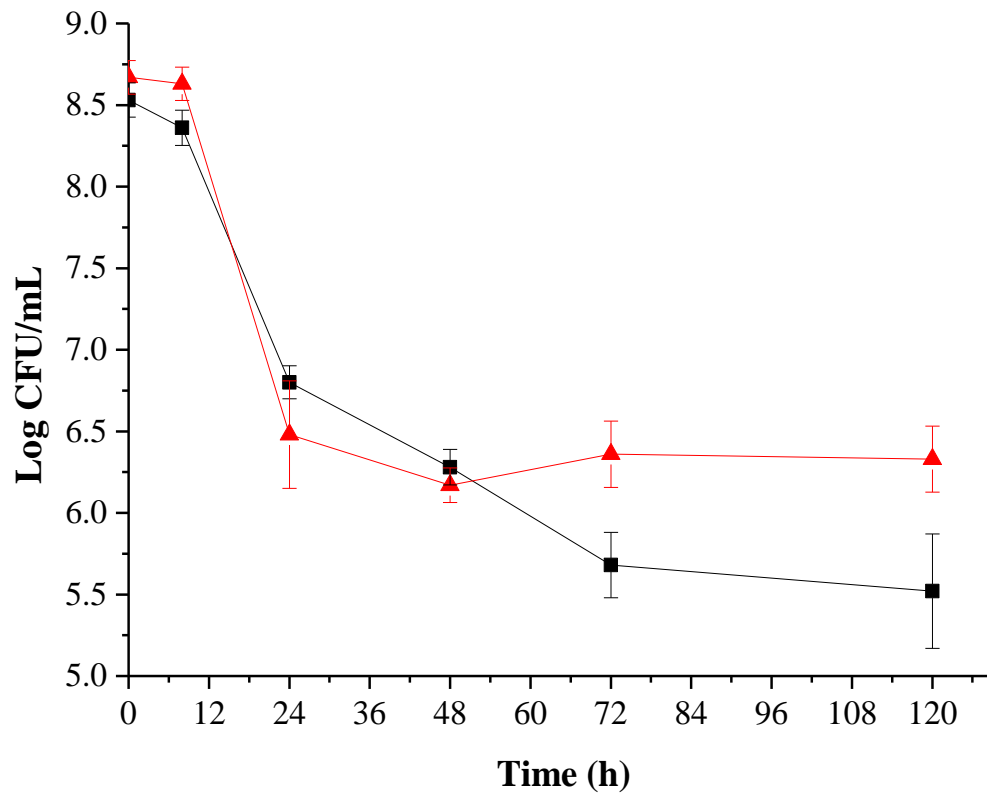


Fig. 1.

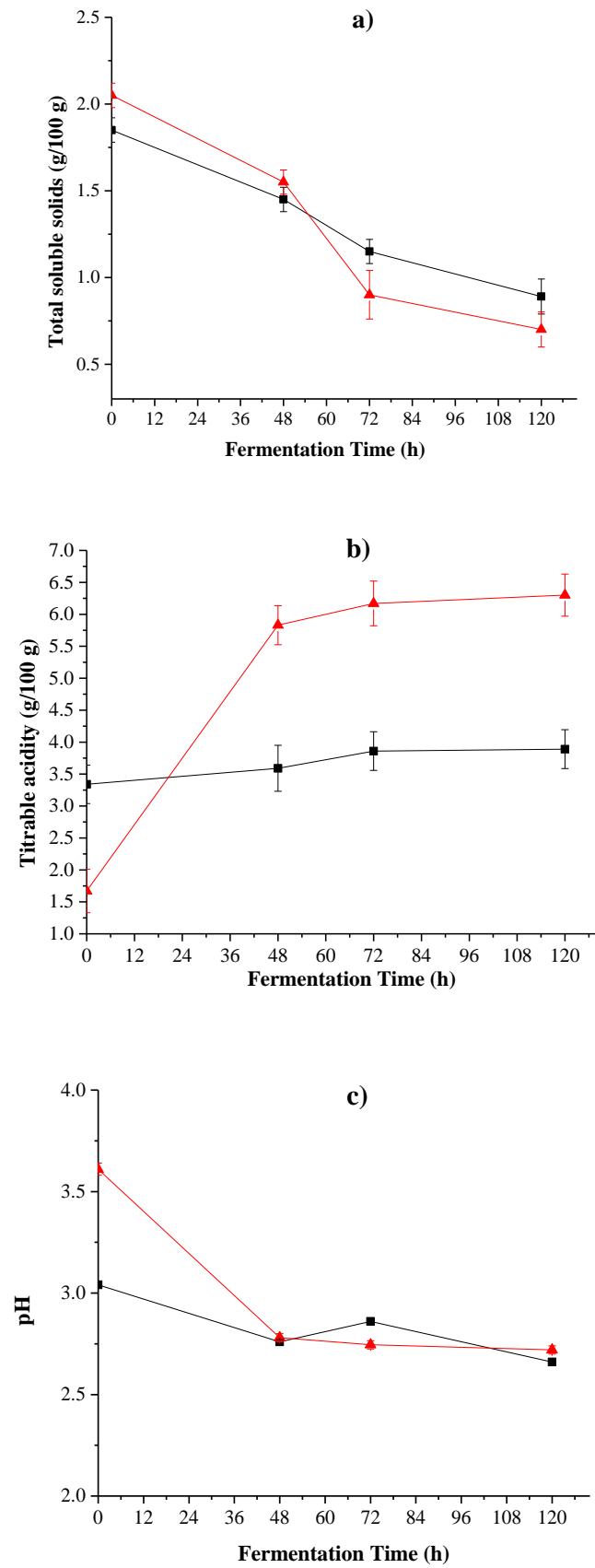


Fig. 2.

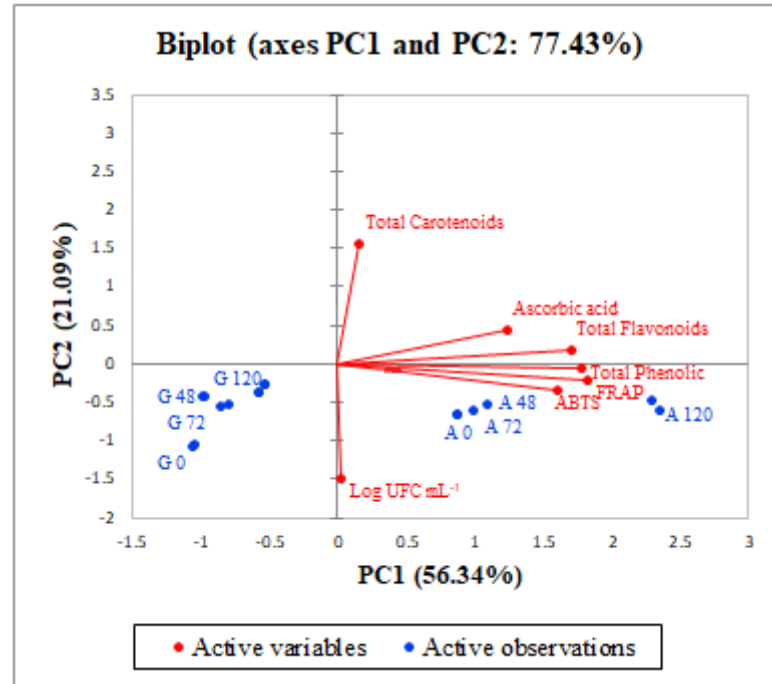


Fig. 3.

Table 1. Physicochemical and colour parameters and contents of different bioactive compounds (mean \pm standard deviation) of acerola (ACE) and guava coproduct (GUA) used in fermentation.

Parameters	Coproduct	
	ACE	GUA
TSS* (g/100 g)	0.85 \pm 0.07 ^b	1.50 \pm 0.01 ^a
TA** (g/100 g)	3.40 \pm 0.01 ^a	1.96 \pm 0.01 ^b
pH	3.84 \pm 0.07 ^b	4.93 \pm 0.06 ^a
Colour parameters		
L value	41.22 \pm 0.66 ^a	44.35 \pm 0.82 ^a
Chroma value	28.20 \pm 0.93 ^a	20.40 \pm 0.26 ^b
Hue° value	49.96 \pm 0.81 ^a	29.57 \pm 2.58 ^b
Bioactive compounds		
Ascorbic acid (mg/100 g)	30.13 \pm 0.03 ^a	10.68 \pm 0.03 ^b
Total carotenoids (mg/100 g)	0.10 \pm 0.01 ^a	0.08 \pm 0.01 ^a
Total flavonoids (mg EC/100 g) ¹	187.80 \pm 11.31 ^a	114.80 \pm 0.04 ^b
Total phenolic (mg EGA/100 g) ²	4886.79 \pm 66.71 ^a	234.72 \pm 3.33 ^b
FRAP (μ mol TEAC/g) ³	2348.65 \pm 11.21 ^a	1096.67 \pm 11.21 ^b
ABTS ⁺⁺ (μ mol TEAC/g) ³	7.90 \pm 0.14 ^a	4.70 \pm 0.28 ^b

*Total soluble solids; **Titrable acidity.

a–b: Mean \pm standard deviation with different lowercase letters on the same column differ ($p \leq 0.05$) among fermented fruit processing coproducts, based on Student's t test.

¹The results are expressed in milligram equivalents of catechin (EC) per hundred grams of sample (mg EC/100 g). ²The results are expressed in milligram equivalents of gallic acid (EGA) per hundred grams of sample (mg EAG/100 g). ³The results are expressed as micromoles of Trolox equivalent antioxidant capacity (TEAC) per gram of sample (μ mol TEAC/g). Abbreviations: FRAP - ferric reducing ability of plasma; ABTS⁺⁺ cation - 2,2-azino-bis (3-ethylbenzo-tiazoline)-6-sulfonic acid.

Table 2. Values of color parameters and contents of bioactive compounds in acerola (ACE) and guava coproducts (GUA) during fermentation with potentially probiotic *Lactobacillus* for 120 h.

Treatments	Fermentation time			
	0 h	48 h	72 h	120 h
Colour parameters				
L value				
ACE	12.20±0.45 ^{Cb}	12.84±0.33 ^{Cb}	17.58±0.03 ^{Bb}	20.27±0.76 ^{Ab}
GUA	18.77±0.14 ^{Da}	21.59±0.24 ^{Ca}	23.63±0.06 ^{Ba}	26.08±0.14 ^{Aa}
Chroma value				
ACE	12.45±0.81 ^{Aa}	9.72±0.42 ^{Ba}	9.33±0.21 ^{Ba}	7.79±0.05 ^{Ca}
GUA	7.73±0.68 ^{Ab}	5.72±0.35 ^{Bb}	5.42±0.18 ^{Bb}	3.28±0.63 ^{Cb}
°Hue value				
ACE	22.36±2.72 ^{Cb}	23.54±0.12 ^{Cb}	24.80±0.75 ^{Bb}	27.71±1.35 ^{Ab}
GUA	28.69±1.77 ^{Ba}	30.21±0.25 ^{Ba}	31.54±3.44 ^{Ba}	43.64±1.92 ^{Aa}
Ascorbic acid (mg/100 g)				
ACE	6.02±0.01 ^{Aa}	4.97±0.01 ^{Da}	5.68±0.01 ^{Ca}	5.98±0.01 ^{Bb}
GUA	2.13±0.01 ^{Cb}	2.60±0.41 ^{Cb}	4.26±0.01 ^{Bb}	6.02±0.01 ^{Aa}
Total carotenoids (mg/100 g)				
ACE	0.02±0.01 ^a	0.02±0.01 ^a	0.03±0.01 ^a	0.03±0.01 ^a
GUA	0.01±0.01 ^a	0.03±0.01 ^a	0.03±0.01 ^a	0.03±0.01 ^a
Total flavonoids (mg EC/100 g) ¹				
ACE	37.56±0.01 ^{Da}	38.96±0.28 ^{Ca}	43.56±0.57 ^{Ba}	44.96±0.01 ^{Aa}
GUA	22.96±0.01 ^{Db}	23.96±0.01 ^{Cb}	24.98±0.01 ^{Bb}	27.96±0.01 ^{Ab}
Total phenolics (mg EAG/100 g) ²				
ACE	977.36±13.34 ^{Da}	1351.89±17.34 ^{Ca}	1717.64±7.07 ^{Ba}	2669.81±21.35 ^{Aa}
GUA	46.94±0.67 ^{Db}	53.96±0.01 ^{Cb}	54.97±0.01 ^{Bb}	60.62±2.67 ^{Ab}
Antioxidant activity				
FRAP (µmol TEAC/g) ³				
ACE	469.73±2.24 ^{Da}	514.11±4.48 ^{Ca}	556.89±2.24 ^{Ba}	768.46±5.60 ^{Aa}
GUA	219.83±1.53 ^{Cb}	245.57±0.41 ^{Bb}	247.07±1.12 ^{Bb}	313.63±1.12 ^{Ab}
ABTS ^{•+} (µmol TEAC/g) ³				
ACE	1.58±0.03 ^{Da}	3.47±0.01 ^{Ca}	4.24±0.01 ^{Ba}	7.59±0.01 ^{Aa}
GUA	0.94±0.06 ^{Bb}	0.98±0.01 ^{Bb}	0.99±0.01 ^{ABb}	1.01±0.01 ^{Ab}

a–b: Mean ± standard deviation with different lowercase letters on the same column differ ($p \leq 0.05$) among fermented fruit processing coproducts, based on Student's t test.

A–D: Mean ± standard deviation with different uppercase letters on the same row differ ($p \leq 0.05$) among fermentation times, based on Tukey's test.

¹ The results are expressed in milligram equivalents of catechin (EC) per hundred grams of sample (mg EC/100 g). ² The results are expressed in milligram equivalents of gallic acid (EAG) per hundred grams of sample (mg EAG/100 g). ³ The results are expressed as micromoles of Trolox equivalent antioxidant capacity (TEAC) per gram of sample (µmol TEAC/g). Abbreviations: ND - not detected; FRAP - ferric reducing ability of plasma; ABTS^{•+} cation - 2,2-azino-bis (3-ethylbenzotiazoline)-6-sulfonic acid.

Table 3 - Phenolic compounds (mean \pm standard deviation) identified in acerola (ACE) and guava coproduct (GUA) during a 120 h-fermentation with potentially probiotic *Lactobacillus*.

Phenolic compounds (mg/100 g)	Time of fermentaiton (h)	ACE	GUA
Kaempferol	0	0.04 \pm 0.01 ^{Aa}	0.02 \pm 0.01 ^{Cb}
	48	0.02 \pm 0.01 ^{Ba}	0.03 \pm 0.01 ^{Ca}
	72	0.02 \pm 0.01 ^{Bb}	0.05 \pm 0.01 ^{Ba}
	120	0.03 \pm 0.01 ^{Ab}	0.10 \pm 0.01 ^{Aa}
Myricetin	0	0.03 \pm 0.01	<LOD
	48	<LOD	0.03 \pm 0.01 ^C
	72	<LOD	0.05 \pm 0.01 ^B
	120	<LOD	0.08 \pm 0.01 ^A
Quercetin	0	0.02 \pm 0.01 ^{Cb}	0.05 \pm 0.01 ^{Aa}
	48	0.02 \pm 0.01 ^{Ca}	0.01 \pm 0.01 ^{Ba}
	72	0.03 \pm 0.01 ^{Ba}	0.01 \pm 0.01 ^{Bb}
	120	0.05 \pm 0.01 ^{Aa}	0.02 \pm 0.01 ^{Bb}
Caffeic acid	0	<LOD	0.01 \pm 0.01
	48	<LOD	<LOD
	72	<LOD	<LOD
	120	<LOD	<LOD
Caftaric acid	0	<LOD	0.02 \pm 0.01
	48	<LOD	<LOD
	72	<LOD	<LOD
	120	0.01 \pm 0.01	<LOD
Chlorogenic acid	0	<LOD	<LOD
	48	<LOD	0.02 \pm 0.01 ^A
	72	<LOD	0.01 \pm 0.01 ^A
	120	<LOD	0.01 \pm 0.01 ^A
Trans-resveratrol	0	<LOD	0.01 \pm 0.01
	48	<LOD	<LOD
	72	0.01 \pm 0.01 ^A	<LOD
	120	0.01 \pm 0.01 ^A	<LOD
Epicatechin	0	0.01 \pm 0.01 ^B	<LOD
	48	0.01 \pm 0.01 ^B	<LOD
	72	0.03 \pm 0.01 ^{Aa}	0.01 \pm 0.01 ^b
	120	0.01 \pm 0.01 ^B	<LOD
Procyanidin B1	0	0.01 \pm 0.01 ^{Aa}	0.01 \pm 0.01 ^{Aa}
	48	0.01 \pm 0.01 ^{Aa}	0.01 \pm 0.01 ^{Aa}
	72	<LOD	0.01 \pm 0.01 ^A
	120	<LOD	0.01 \pm 0.01 ^A
Procyanidin A2	0	0.03 \pm 0.02	<LOD
	48	<LOD	<LOD
	72	<LOD	<LOD
	120	<LOD	0.04 \pm 0.01

a-b: Mean \pm standard deviation with different lowercase letters on the same column differ ($p \leq 0.05$) among fermented fruit processing coproducts, based on t-Student test.

A-C: Mean \pm standard deviation with different uppercase letters on the same row differ ($p \leq 0.05$) among fermentation times, based on Tukey's test.

<LOD: below the limit of detection