

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

HELOISA MARIA ALMEIDA DO NASCIMENTO

**ESTABILIDADE E BIOACESSIBILIDADE DE
NUTRACÊUTICOS COMPOSTOS POR *Limosilactobacillus fermentum* E CASCA DE
JABUTICABA [*Myrciaria cauliflora* (Mart.) O. Berg]**

João Pessoa

2025

HELOISA MARIA ALMEIDA DO NASCIMENTO

**ESTABILIDADE E BIOACESSIBILIDADE DE NUTRACÊUTICOS
COMPOSTOS POR *Limosilactobacillus fermentum* E CASCA DE JABUTICABA
[*Myrciaria cauliflora* (Mart.) O. Berg]**

João Pessoa

2025

HELOSA MARIA ALMEIDA DO NASCIMENTO

**ESTABILIDADE E BIOACESSIBILIDADE DE NUTRACÊUTICOS COMPOSTOS
POR *Limosilactobacillus fermentum* E CASCA DE JABUTICABA [*Myrciaria cauliflora*
(Mart.) O. Berg]**

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciências da Nutrição, do Centro de Ciências da Saúde, da Universidade Federal da Paraíba, como requisito para obtenção do título de Doutor em Ciências da Nutrição.

Orientador: Prof. Dr. Evandro Leite de Souza

João Pessoa

2025

Catálogo na publicação
Seção de Catalogação e Classificação

N244e Nascimento, Heloisa Maria Almeida do.

Estabilidade e bioacessibilidade de nutracêuticos compostos por *Limosilactobacillus fermentum* e casca de jabuticaba [*Myrciaria cauliflora* (Mart.) O. Berg] / Heloisa Maria Almeida do Nascimento. - João Pessoa, 2025.

118 f. : il.

Orientação: Evandro Leite de Souza Souza.
Tese (Doutorado) - UFPB/CCS.

1. Nutracêuticos. 2. Probióticos. 3. Compostos fenólicos. 4. Capacidade antioxidante. 5. *Myrciaria cauliflora*. 6. Jabuticaba. I. Souza, Evandro Leite de. II. Título.

UFPB/BC

CDU 612.3(043)

HELOSA MARIA ALMEIDA DO NASCIMENTO

**ESTABILIDADE E BIOACESSIBILIDADE DE NUTRACÊUTICOS COMPOSTOS
POR *Limosilactobacillus fermentum* E CASCA DE JABUTICABA [*Myrciaria cauliflora*
(Mart.) O. Berg]**

BANCA EXAMINADORA

Documento assinado digitalmente
 **EVANDRO LEITE DE SOUZA**
Data: 06/05/2025 17:56:48-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Prof. Dr. Evandro Leite de Souza
Orientador (DN/CCS/UFPB)
Presidente da Banca Examinadora

Documento assinado digitalmente
 **ESTEFANIA FERNANDES GARCIA**
Data: 13/05/2025 08:48:18-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Prof^a. Dra. Estefânia Fernandes Garcia
Examinadora interna (DG/CTDR/UFPB)

Documento assinado digitalmente
 **FILLIPE DE OLIVEIRA PEREIRA**
Data: 07/05/2025 11:40:04-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Prof. Dr. Fillipe de Oliveira Pereira
Examinador interno (PPGCN/DN/CCS/UFPB)

Documento assinado digitalmente
 **TALIANA KENIA ALENCAR BEZERRA**
Data: 09/05/2025 05:53:06-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Prof^a. Dra. Taliana Kênia Alencar Bezerra
Examinadora Externa ao programa (DEA/CT/UFPB)

Documento assinado digitalmente
 **ANA HELONEIDA DE ARAÚJO MORAIS**
Data: 07/05/2025 15:57:25-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Prof^a. Dra. Ana Heloneida de Araújo Morais
Examinadora Externa à instituição (PPGNUT/DN/UFRN)

AGRADECIMENTOS

A Deus, pelo dom da vida, por ter permitido que todo o trabalho fosse desenvolvido da melhor maneira possível. Ele que sempre me deu forças para nunca desistir.

Aos meus pais, responsáveis por terem me guiado pelos melhores caminhos da vida, permitindo que eu chegasse até aqui sempre com educação e zelo.

A minha linda e amada filha, Bianca Falcão, por quem eu sempre procuro crescer e dar o meu melhor. Obrigada por cada “te amo mãe”, que você me diz diariamente. Toda vez que escuto sinto que é hora de desacelerar e te dar muitos abraços e beijos. Meu bem mais precioso na Terra. Sem você a mamãe não seria tão forte. Te amo!!

Ao meu esposo, Elson Filho, por me incentivar diariamente através de palavras e ações. Sua determinação em tudo que faz, me encoraja a cada dia buscar novos desafios.

Às minhas irmãs, Helenise e Ana Luisa, pelas brincadeiras e atenção, pois mesmo estando distante, nossa sintonia é única.

Ao meu orientador prof. Dr. Evandro Leite de Souza, por todo apoio, disponibilidade e cuidado com toda pesquisa desenvolvida. Agradeço pela oportunidade de crescimento pessoal e profissional. Todo seu trabalho desenvolvido na UFPB foi fundamental para que várias portas estivessem abertas durante o desenvolvimento da pesquisa.

À professora Dra. Maria Lúcia da Conceição, minha chefe e colega de trabalho, uma pessoa maravilhosa de um coração imenso, que sempre me incentivou no desenvolvimento dessa pesquisa, e à Sônia, minha colega de trabalho, que me ajudou disponibilizando material e ajudando no desenvolvimento de análises.

Ao meu companheiro de projeto, Jaielison Yandro, conseguimos manter uma parceria de crescimento, ajuda e amizade. Foi muito bom trabalhar com você, que é uma pessoa cuidadosa com tudo que faz e sempre muito disponível para ajudar todos ao seu redor.

À Rossana Lucena e Diego Melo pelo fornecimento das jabuticabas e por terem me recebido muito bem.

A Universidade Federal da Paraíba, em especial ao Departamento de Nutrição e aos Professores do Programa de Pós-graduação em Ciências da Nutrição (PPGCN), por todo conhecimento durante o doutorado.

RESUMO

A utilização de nutracêuticos formulados com probióticos e compostos bioativos presentes em frutas, tem sido investigada como uma alternativa para a prevenção de diversas doenças, em virtude de seus efeitos antioxidantes e da capacidade de modular a microbiota intestinal. O presente estudo teve como objetivo desenvolver e analisar a estabilidade de novos nutracêuticos contendo casca liofilizada de jabuticaba (LCJ) e uma mistura de potenciais cepas probióticas de *Limosilactobacillus fermentum* [139, 263 e 296]. Para isso, foram avaliados os efeitos das condições de armazenamento (11% de umidade relativa, 4 e 25 °C/90 dias) na estabilidade de duas formulações nutracêuticas (JM: LCJ + cultura mista de *L. fermentum*; JFM: LCJ + cultura mista de *L. fermentum* + frutooligossacarídeos), por meio da determinação da estabilidade térmica, contagem de células viáveis, estado fisiológico bacteriano, teor de compostos fenólicos e atividade antioxidante durante 90 dias de armazenamento. Também foram avaliados a bioacessibilidade dos compostos fenólicos, viabilidade celular, estado fisiológico, conteúdo de fenólicos e atividade antioxidante, antes e durante cada fase da digestão gastrointestinal simulada, de JM e JFM armazenados a 4 °C/11% UR nos tempos zero, 45 e 90 dias. Os resultados destacaram que ambos os nutracêuticos (JM e JFM) mantiveram estabilidade térmica e alta concentração de compostos fenólicos e atividade antioxidante durante o armazenamento. A formulação JFM apresentou maior viabilidade celular de *L. fermentum*, especialmente sob refrigeração. Apesar de variações no estado fisiológico das células, a viabilidade e funcionalidade das cepas foram preservadas em ambas as formulações, independentemente da temperatura de armazenamento. A investigação sobre bioacessibilidade de compostos fenólicos, atividade antioxidante e viabilidade de *L. fermentum* durante o armazenamento a 4 °C e 11% de umidade relativa, revelaram que após digestão gastrointestinal simulada, a formulação JFM exibiu a maior viabilidade celular e resistência às alterações, com alta contagem de células vivas e baixa contagem de células mortas, embora algumas células estivessem em estado VBNC (viáveis, mas não cultiváveis). A absorção de antocianinas foi predominante no estômago, enquanto o ácido elágico foi mais biodisponível no intestino. A atividade antioxidante diminuiu durante a digestão. Ambos os nutracêuticos liberaram compostos fenólicos biodisponíveis e células potencialmente probióticas durante os ensaios. JFM destacou-se como o nutracêutico mais promissor, e a casca de jabuticaba como um ingrediente importante para formulações contendo cepas potencialmente probióticas.

Palavras-chave: *Myrciaria cauliflora*; estabilidade; probióticos; compostos fenólicos; capacidade antioxidante; nutracêuticos.

ABSTRACT

The use of nutraceuticals formulated with probiotics and bioactive compounds present in fruits, has been investigated as an alternative for the prevention of several diseases, due to their antioxidant effects and the ability to modulate the intestinal microbiota. The present study aimed to develop and analyze the stability of new nutraceuticals containing freeze-dried jabuticaba peel (FJP) and a mixture of potential probiotic strains of *Limosilactobacillus fermentum* [139, 263 and 296]. For this purpose, the effects of storage conditions (11% relative humidity, 4 and 25 °C/90 days) on the stability of two nutraceutical formulations (JM: FJP + mixed culture of *L. fermentum*; JFM: FJP + mixed culture of *L. fermentum* + fructooligosaccharides) were evaluated by determining thermal stability, viable cell count, bacterial physiological state, phenolic compound content and antioxidant activity during 90 days of storage. The bioaccessibility of phenolic compounds, cell viability, physiological state, phenolic content and antioxidant activity were also evaluated, before and during each phase of simulated gastrointestinal digestion, of JM and JFM stored at 4 °C/11% RH at times zero, 45 and 90 days. The results highlighted that both nutraceuticals (JM and JFM) maintained thermal stability and high concentration of phenolic compounds and antioxidant activity during storage. The JFM showed greater in the cell viability of *L. fermentum*, especially under refrigeration. Despite variations in the physiological state of the cells, the viability and functionality of the strains were preserved in both formulations, regardless of the storage temperature. The investigation of bioaccessibility of phenolic compounds, antioxidant activity and viability of *L. fermentum* during storage at 4 °C and 11% relative humidity revealed that after simulated gastrointestinal digestion, the JFM formulation exhibited the highest cell viability and resistance to changes, with high live cell counts and low dead cell counts, although some cells were in the VBNC (viable but not cultivable) state. Anthocyanin absorption was predominant in the stomach, while ellagic acid was more bioavailable in the intestine. Antioxidant activity decreased during digestion. Both nutraceuticals released bioavailable phenolic compounds and active probiotic cells during the assays. JFM stood out as the most promising nutraceutical, and freeze-dried jabuticaba peel as an important ingredient for formulations containing potentially probiotic strains.

Keywords: *Myrciaria cauliflora*; stability; probiotics; phenolic compounds; antioxidant capacity; nutraceuticals.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

FIGURAS DA TESE

Figura 1 -	Nutracêutico e seus benefícios associados à saúde humana.....	19
Figura 2 -	Administração oral, disponibilidade e interações dos probióticos e fenólicos presentes na formulação nutracêutica.....	21
Figura 3 -	Jaboticabeira com frutos maduros.....	22
Figura 4 -	Estrutura química básica das antocianinas.....	28
Figura 5 -	Mecanismos de ação de microrganismos probióticos.....	32
Figura 6 -	Combinação de cepas probióticas com fonte de compostos fenólicos.....	36
Figura 7 -	Desenho do estudo da estabilidade dos nutracêuticos.....	39
Figura 8 -	Etapa de obtenção do liofilizado da casca da jaboticaba.....	40
Figura 9 -	Formulações nutracêuticas após a liofilização.....	42

FIGURAS DO APÊNDICE A – ARTIGO ORIGINAL I

Figure 1 -	DSC (A) and TG (B) curves of JM, JFM, and fructooligosaccharides (FOS) at the beginning of storage under controlled humidity conditions (11% RH). JM: <i>L. fermentum</i> mix + freeze-dried jaboticaba peel; JFM: <i>L. fermentum</i> mix + freeze-dried jaboticaba peel + fructooligosaccharides....	80
Figure 2 -	Scanning electron micrograph of JM and JFM under controlled humidity (11% RH) on days zero (T0) and 90 (T90) of refrigerated and room temperature storage [RefT (4 ± 0.5 °C) and RoT (25 ± 0.5 °C), respectively]. JM: <i>L. fermentum</i> mix + freeze-dried jaboticaba peel; JFM: <i>L. fermentum</i> mix + freeze-dried jaboticaba peel + fructooligosaccharides	81
Figure 3 -	Sizes (% , average $\pm$ standard deviation, n = 3) of the cell subpopulation of <i>Limosilactobacillus fermentum</i> cells in JM and JFM during 90 days of refrigerated and room temperature storage [RefT (4 ± 0.5 °C) and RoT (25 ± 0.5 °C)]. JM: <i>L. fermentum</i> mix + freeze-dried jaboticaba peel; JFM: <i>L. fermentum</i> mix + freeze-dried jaboticaba peel + fructooligosaccharides. PI-cFDA+: non-permeabilized cells with enzymatic activity; PI+ cFDA-: permeabilized cells without enzymatic activity; and PI+ cFDA+, considered injured cells with enzymatic activity.....	82
Figure 4 -	(A) Principal Component Analysis (PCA) run for results (variables: <i>L. fermentum</i> viable cell count, <i>L. fermentum</i> cell physiological status, and antioxidant activity) of JM and JFM at 11% relative humidity on days zero, 15, 30, 60, and 90 of refrigerated and room temperature storage [RefT (4 ± 0.5 °C) and RoT (25 ± 0.5 °C)]. (B) Correlation coefficients indicate the associations between viable cell count, cellular physiological status, and antioxidant activity.....	85

FIGURAS DO APÊNDICE B – ARTIGO ORIGINAL II

- Figure 1 -** Physiological status of *Limosilactobacillus fermentum* cells in JM and JFM exposed to simulated gastrointestinal conditions. JM: *L. fermentum* mix + freeze-dried jabuticaba peel; JFM: *L. fermentum* mix + freeze-dried jabuticaba peel + fructooligosaccharides. A (JM, day zero), B (JM, 45 days), C (JM, 90 days), D (JFM, day zero), E (JFM, 45 days) and F (JFM, 90 days). Results are expressed as average $\pm$ standard deviation (n 3). a–d: different lowercase letters denote differences between distinct digestion steps, based on Tukey's test ($p \leq 0.05$) 115
- Figure 2 -** Bioaccessibility of ellagic acid (A and B), gallic acid (C and D), and cyanidin-3-O-glucoside (E and F), expressed as the percentage of compounds released during the simulated digestion concerning the content in the corresponding sample. JM: nutraceutical composed of freeze-dried jabuticaba peel and mixed culture of *Limosilactobacillus fermentum*; JFM: nutraceutical composed of freeze-dried jabuticaba peel fructooligosaccharides and culture of *L. fermentum*..... 117
- Figure 3 -** Principal component analysis (PCA) considering variables measured in JM and JFM at days zero, 45, and 90 of refrigerated storage (4 ± 0.5 °C) when exposed to simulated gastrointestinal digestion. Variables: physiological state of *Limosilactobacillus fermentum* cells, antioxidant activity, and content of phenolic compounds..... 119

LISTA DE QUADROS

QUADROS DA TESE

Quadro - 1	Estudos sobre a utilização dos subprodutos da jabuticaba e seus principais efeitos.....	24
-------------------	---	----

LISTA DE TABELAS

TABELAS DO APÊNDICE A – ARTIGO ORIGINAL I

Table 1.	Water activity (aw), solubility, and hygroscopicity (average $\pm$ standard deviation, n = 3) in JM and JFM on days zero, 15, 30, 60 and 90 of storage under room and refrigerated temperature [RoT (25 ± 0.5 °C) and RefT (4 ± 0.5 °C), respectively].....	80
Table 2.	Survival rate (%), average $\pm$ standard deviation, n = 3) of <i>Limosilactobacillus fermentum</i> cells in JM and JFM on days zero, 15, 30, 60 and 90 of storage under room and refrigerated temperature [RoT (25 ± 0.5 °C) and RefT (4 ± 0.5 °C)].....	81
Table 3.	Contents of phenolic compounds (mg/100 g, average $\pm$ standard deviation, n = 3) in JM and JFM on days zero, 15, 30, 60 and 90 of refrigerated and room temperature storage [RefT (4 ± 0.5 °C) and RoT (25 ± 0.5 °C)].....	83
Table 4.	Antioxidant activity (average $\pm$ standard deviation, n = 3) of JM and JFM on days zero, 15, 30, 60, and 90 of refrigerated and room temperature storage [RefT (4 ± 0.5 °C) and RoT (25 ± 0.5 °C)].....	84

TABELAS DO APÊNDICE B – ARTIGO ORIGINAL II

Table 1.	Viable cell counts (Log CFU/mL; average $\pm$ standard deviation; n: 3) of <i>Limosilactobacillus fermentum</i> in JM and JFM on days zero, 45 and 90 of refrigerated storage (4 ± 0.5 °C) when exposed to simulated gastrointestinal digestion.....	114
Table 2.	Content (mg/100g; average $\pm$ standard deviation, n = 3) of phenolic compounds in nutraceuticals JM and JFM when exposed to simulated gastrointestinal digestion ¹	116
Table 3.	Antioxidant capacity (average $\pm$ standard deviation; n = 3) determined with ABTS, DPPH, and FRAP methods of JM and JFM on days zero, 45 and 90 of refrigerated storage (4 ± 0.5 °C) when exposed to simulated gastrointestinal digestion.....	118

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	16
2	REFERENCIAL TEÓRICO.....	18
2.1	NUTRACÊUTICOS: CONCEITOS E LIMITAÇÕES NO PROCESSAMENTO E ARMAZENAMENTO.....	18
2.2	JABUTICABA [<i>Myrciaria cauliflora</i> (Mart.) O. Berg].....	22
2.3	COMPOSTOS FENÓLICOS: CONCEITO E BIOACESSIBILIDADE.....	25
2.3.1	Antocianinas.....	27
2.4	PROBIÓTICOS: CONCEITO E TÉCNICAS DE VIABILIDADE.....	29
2.4.1	Interações entre compostos fenólicos e probióticos.....	34
3	MATERIAL E MÉTODOS.....	38
3.1	OBTENÇÃO E HIGIENIZAÇÃO DA MATÉRIA PRIMA.....	38
3.2	LOCAL DE EXECUÇÃO DA PESQUISA.....	38
3.3	ELABORAÇÃO DO LIOFILIZADO DA CASCA DA JABUTICABA (LCJ)....	38
3.4	PREPARAÇÃO DE CULTURA MISTA DE <i>L. fermentum</i> E CONTAGEM DE CÉLULAS VIÁVEIS.....	38
3.5	ELABORAÇÃO DOS NUTRACÊUTICOS.....	41
3.6	ANÁLISE TÉRMICA DOS NUTRACÊUTICOS.....	43
3.7	DETERMINAÇÃO DA ESTABILIDADE DOS NUTRACÊUTICOS.....	43
3.7.1	Atividade de água.....	43
3.7.2	Determinação de solubilidade.....	44
3.7.3	Análise de higroscopicidade.....	44
3.8	AVALIAÇÃO DE CARACTERÍSTICAS ULTRAESTRUTURAIS DOS NUTRACÊUTICOS.....	44
3.9	AVALIAÇÃO DO ESTADO FISIOLÓGICO DA CULTURA MISTA PROBIÓTICA.....	45
3.9.1	Procedimento de coloração.....	45
3.9.2	Análise em citometria de fluxo.....	45
3.10	DETERMINAÇÃO DOS COMPOSTOS FENÓLICOS.....	46
3.10.1	Determinação das antocianinas.....	46
3.10.2	Ácidos fenólicos.....	46
3.11	CAPACIDADE ANTIOXIDANTE DOS NUTRACÊUTICOS DURANTE O ARMAZENAMENTO.....	48
3.11.1	Obtenção dos extratos.....	49
3.11.2	Capacidade antioxidante – Método DPPH'.....	49
3.11.3	Capacidade antioxidante – Método FRAP.....	50

3.11.4	Capacidade antioxidante – Método ABTS ⁺	50
3.12	EXPOSIÇÃO DOS NUTRACÊUTICOS À DIGESTÃO GASTROINTESTINAL SIMULADA.....	51
3.12.1	Enumeração de células viáveis e avaliação do estado fisiológico celular.....	52
3.12.2	Determinação da bioacessibilidade dos compostos fenólicos.....	52
3.12.3	Determinação da capacidade antioxidante durante exposição às condições simuladas do TGI.....	52
3.13	ANÁLISES ESTATÍSTICAS.....	53
4	RESULTADOS.....	54
	REFERÊNCIAS.....	57
	APÊNDICES.....	75
	APÊNDICE A – ARTIGO ORIGINAL I.....	75
	APÊNDICE B – ARTIGO ORIGINAL II.....	91

1 INTRODUÇÃO

Nos últimos anos, com a mudança no estilo de vida da população devido o reconhecimento da importância da dieta na condição de saúde, os consumidores têm se tornado mais interessados em fazer escolhas por alimentos e produtos dietéticos que possam promover saúde e bem-estar (Desai *et al.*, 2021; Makkar *et al.*, 2020). Os nutracêuticos são produtos formados por compostos bioativos disponíveis em formulações apresentadas como pílulas, tabletes ou cápsulas (Ali *et al.*, 2019) e conceitualmente variam de suplemento dietético a alimento, surgem como alternativas de consumo com propriedades profiláticas e terapêuticas coadjuvantes na prática clínica (Chelluboina; Vemuganti, 2021). Os principais compostos bioativos utilizados na formulação de nutracêuticos são minerais, vitaminas, probióticos, fibras dietéticas e compostos fenólicos (Cádiz-Gurrea *et al.*, 2020; Feng; Wang, 2020).

A eficácia dos nutracêuticos na promoção da saúde depende da qualidade da formulação, de modo que a caracterização físico-química é uma etapa indispensável do processo de produção devido a sua influência na estabilidade do produto durante o armazenamento (Andrade *et al.*, 2020). Nesse contexto, as propriedades térmicas e a análise microscópica do material fornecem informações importantes para o estabelecimento da condição de armazenamento mais estável, evitando perdas de funcionalidade e dificuldades de comercialização (Samas *et al.*, 2021). A temperatura e umidade relativa são os fatores determinantes para a ocorrência de alterações físicas que podem interferir na estabilidade dos componentes bioativos promotores da saúde utilizados na elaboração de nutracêuticos (Dantas *et al.*, 2021).

Os probióticos são definidos como microrganismos vivos que, quando consumidos em doses adequadas, promovem benefício à saúde dos consumidores (Hill *et al.*, 2014). Vários benefícios têm sido associados com a incorporação de probióticos em alimentos e nutracêuticos, como efeito protetor frente à hipertensão (Latif *et al.*, 2023), propriedade imunomoduladora (Mazziotta *et al.*, 2023), modulação benéfica da microbiota intestinal e proteção do organismo contra a invasão de patógenos (Souza *et al.*, 2019; Ferreira *et al.*, 2022). Cepas de *Lactobacillus fermentum*, reclassificado taxonomicamente em *Limosilactobacillus fermentum*, são amplamente estudadas e utilizados como probióticos, estando presentes em diferentes nichos ecológicos, com importante participação na indústria de alimentos (Freire *et al.*, 2024).

A jabuticaba [*Myrciaria cauliflora* (Mart.) O. Berg] é uma espécie vegetal nativa da Mata Atlântica brasileira e seu fruto é bastante apreciado pelos consumidores, devido as suas características sensoriais. A espécie produz uma fruta conhecida por suas características únicas,

sendo umas das poucas frutas que crescem diretamente no tronco e galhos da planta. No processo industrial, a polpa da jabuticaba corresponde a maior participação no mercado devido seu sabor doce e suculência, enquanto a casca e sementes são, de forma geral, pouco atrativas devido ao sabor adstringente e textura mais rígida (Nunes *et al.*, 2021; Barroso *et al.*, 2022). No entanto, a casca e sementes da jabuticaba destacam-se pelo seu valor nutricional, apresentando vitaminas, minerais, fibras alimentares (Faller *et al.*, 2023) e compostos fenólicos, principalmente antocianinas, derivados do ácido elágico e gálico (Trindade *et al.*, 2022; Neves *et al.*, 2022).

Os compostos fenólicos são metabólitos caracterizados pela presença de anel aromático, com, pelo menos, uma hidroxila (-OH) ligada (Vilvert *et al.*, 2024). Esses compostos têm recebido crescente interesse por suas propriedades antioxidantes bem reconhecidas, mas também por seus efeitos moduladores da microbiota intestinal e de proteção de microrganismos probióticos durante a passagem pelo trato gastrointestinal (Silva *et al.*, 2023b; Saleh *et al.*, 2020).

A ingestão combinada de compostos fenólicos e probióticos tem sido reconhecida como potencial estratégia para aumentar os efeitos benéficos à saúde desses componentes, embora ainda seja pouco explorada (Souza *et al.*, 2019; Maftai *et al.*, 2024; Cruz Neto *et al.*, 2024). Em estudo prévio foram avaliados os efeitos de nutracêuticos contendo liofilizado da casca da jabuticaba e cultura mista de cepas de *L. fermentum* (139, 263 e 296) candidatas para uso como probióticos na composição da microbiota intestinal humana, produção de metabólitos e atividade antioxidante durante fermentação colônica *in vitro* ao longo de 48 horas. Os resultados mostraram que houve aumento na abundância relativa de *Lactobacillus* spp./*Enterococcus* spp., *Bifidobacterium* spp. e *Ruminococcus albus*/R. *favefaciens* e redução da abundância relativa de *Bacteroides* spp./*Prevotella* spp., *Clostridium histolyticum* e *Eubacterium rectale*/C. *coccoides* (Silva *et al.*, 2023a). Diante dos resultados obtidos, a associação da casca da jabuticaba com a cultura mista de *L. fermentum* na composição do nutracêutico mostrou efeitos benéficos na composição da microbiota intestinal, porém ainda se torna necessário avaliar a estabilidade do produto e da bioacessibilidade dos compostos fenólicos presentes na sua composição.

Dessa forma, o presente estudo teve como objetivo avaliar a estabilidade de nutracêuticos compostos por liofilizado da casca de jabuticaba e cultura mista de cepas potencialmente probióticas de *L. fermentum* 263, 296 e 139 durante 90 dias de armazenamento controlado, analisar a bioacessibilidade dos compostos fenólicos e estado fisiológico das células de *L. fermentum* antes e durante exposição às condições simuladas do trato gastrointestinal humano nos tempos zero, 45 e 90 dias de armazenamento.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 NUTRACÊUTICOS: CONCEITO E LIMITAÇÕES NO PROCESSAMENTO E ARMAZENAMENTO

A definição de nutracêuticos ainda não é bem estabelecida. O termo “nutracêutico” foi introduzido em 1989, por Stephen DeFelice, combinando as terminologias “nutrição” e “farmacêutico” (Suleria *et al.*, 2015). De forma mais simples, os nutracêuticos são formados por substâncias bioativas, que exercem benefícios à saúde, além de propriedades nutricionais. Estes produtos surgem a partir de pesquisas especializadas, visando a sua eficácia e segurança, sendo apresentados em formas farmacêuticas (pílula, cápsula, pós, líquidos e géis) (Makkar *et al.*, 2020; Chelluboina; Vemuganti, 2021; Bommakanti *et al.*, 2023).

À medida que evidências científicas sólidas acerca dos efeitos benéficos do consumo de nutracêuticos sobre parâmetros relacionados à saúde avançam, ocorre o aumento do interesse pelo seu consumo. A população europeia e norte-americana tem aumentado o consumo de nutracêuticos, de modo que esses produtos têm passado a compor a dieta dos indivíduos, impulsionados pelo aumento de doenças crônicas não transmissíveis relacionadas ao estilo de vida (Reque; Brandelli, 2021). O mercado global de nutracêuticos alcançou US\$ 289,8 bilhões em 2021, como expectativa de alcançar US\$ 438,9 bilhões até 2026, e que ocorra crescimento com taxa anual de 8,7% no período de 2021 a 2026 (BBC, 2021).

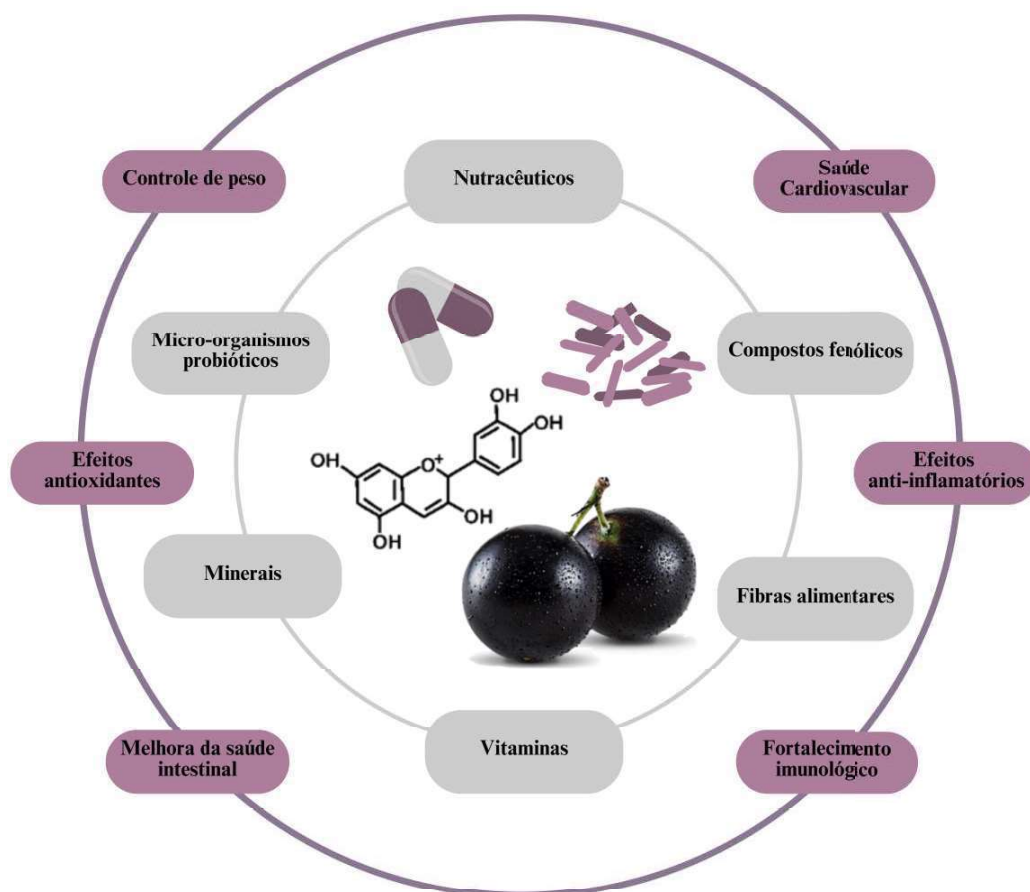
No Brasil não existe legislação própria para os nutracêuticos, de modo que para fins de comercialização podem seguir a RDC nº 243 de 26 de julho de 2018, que dispõe sobre os requisitos para composição, qualidade, segurança e rotulagem dos suplementos alimentares (BRASIL, 2018a), a Instrução Normativa nº 28 de 26 de julho de 2018, que estabelece as listas de constituintes, de limites de uso, de alegações e de rotulagem complementar dos suplementos alimentares (BRASIL, 2018b) e quando contiverem probióticos na composição podem seguir a RDC nº 241 de 26 de julho de 2018, que dispõe sobre os requisitos para comprovação da segurança e dos benefícios à saúde dos probióticos para uso em alimentos (BRASIL, 2018c).

Além disso, cada país segue uma legislação específica, o que dificulta o compartilhamento de regulações para avaliação e comprovação da segurança, mecanismo de ação e eficácia dos nutracêuticos. Dessa forma, a segurança e eficácia dos efeitos sobre a saúde precisa ser fundamentada em dados clínicos provenientes de ensaios *in vivo* (Durazzo *et al.*, 2020; Reque; Brandelli, 2021). Os nutracêuticos são formados por compostos naturais presentes em alimentos e plantas, como os fitoquímicos, administrados em forma farmacêutica, com

propriedades nutricionais e efeitos benéficos à saúde, reconhecidos em estudos *in vivo* (Sampaio *et al.*, 2021; Nascimento *et al.*, 2022).

Vitaminas, minerais, compostos fenólicos, fibras alimentares e probióticos (Figura 1) têm sido os principais constituintes utilizados no desenvolvimento de formulações nutracêuticas (Basholli-Salihi *et al.*, 2019; Paudel *et al.*, 2022). Esses produtos têm ganhado atenção devido a necessidade de alternativas de origem natural em substituição aos produtos farmacêuticos, como ferramenta na prevenção de doenças e melhora no estilo de vida (Reque; Brandelli, 2021). Porém, os compostos fenólicos e probióticos são considerados os componentes de maior interesse industrial devido a seus efeitos benéficos à saúde, incluindo melhora de respostas imunológicas e modulação da microbiota intestinal (Silva *et al.*, 2023b; AlAli *et al.*, 2021).

Figura 1 - Nutracêutico e seus benefícios associados à saúde humana



Fonte: Adaptado de Makkar *et al.* (2020)

Os nutracêuticos compostos de probióticos e compostos fenólicos provenientes de matriz vegetal podem apresentar algumas limitações no processamento e armazenamento (Dantas *et al.*, 2021). Entre as principais limitações para manter a estabilidade de formulações contendo probióticos estão as modificações de pH, presença de oxigênio, umidade relativa e altas temperaturas. Por isso, alguns pontos são levados em consideração na avaliação da estabilidade desses produtos, como a sobrevivência, viabilidade celular e atividade metabólica das células dos probióticos, assim como a biodisponibilidade dos compostos fenólicos, manutenção da atividade antioxidante (Reque; Brandelli, 2021), higroscopicidade e solubilidade (Nishimoto-Sauced *et al.*, 2021; Ng *et al.*, 2022).

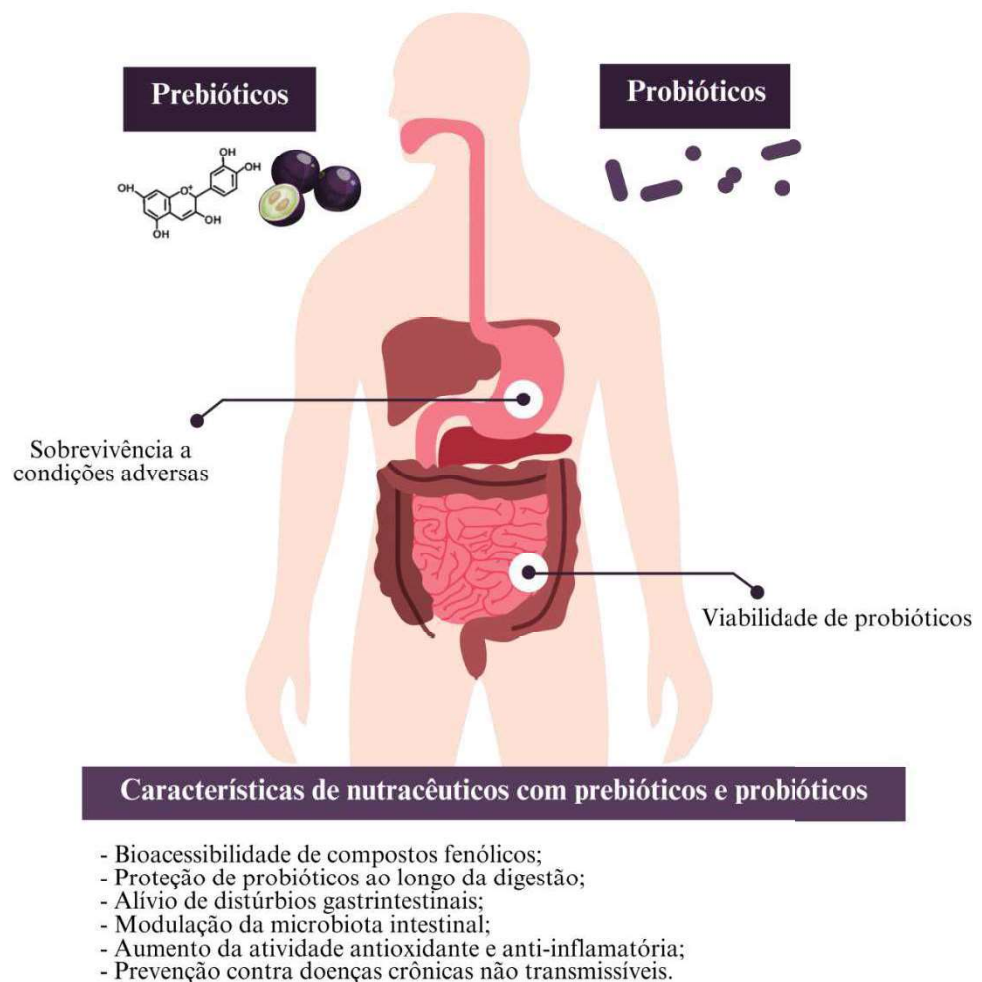
A higroscopicidade e solubilidade são aspectos ligados à estabilidade do produto sob o ponto de vista físico, químico e microbiológico. A higroscopicidade é uma propriedade físico-química definida como a suscetibilidade de partículas em absorver água do ambiente, sendo considerada uma propriedade inerente à presença de grupos polares na estrutura (Han *et al.*, 2022). A elevada higroscopicidade pode causar alterações nas propriedades físico-químicas do material, e, conseqüentemente, resultar em maior instabilidade durante o armazenamento e, eventualmente, em efeitos adversos na biodisponibilidade de compostos bioativos (Ng *et al.*, 2022). O controle da umidade para alcance de estabilidade das formulações nutracêuticas pode ser atingida por meio do uso de sais, como cloreto de lítio (LiCl), com umidade conhecida (11%) (Prakash *et al.*, 2023). A solução de LiCl pode ser utilizada em sistemas alimentares, visto ser considerada inodora, não volátil e atóxica (Gu *et al.*, 2022).

Nascimento *et al.* (2022) avaliaram *in vitro* de nutracêutico composto por *L. fermentum* 296, quercetina e resveratrol, submetida a três diferentes umidades relativas (11%, 22% e 33%) e duas temperaturas de armazenamento (4 °C e 25 °C), com base na determinação da estabilidade térmica, estado fisiológico e viabilidade das células de cepas probióticas durante 90 dias de armazenamento. Foi relatado que as diferentes umidades relativas não afetaram as reações endotérmicas e perda de massa do nutracêutico, porém a contagem de células viáveis ($>6 \log \text{ CFU/g}$) se manteve mais estável na umidade relativa de 11%, gerada por meio de solução de LiCl, e temperatura de 4 °C. O conteúdo de quercetina e resveratrol não sofreu influência da temperatura de armazenamento, sendo mantido valores superiores a 129.28 ± 0.96 e $132.33 \pm 1.78 \mu\text{g/mg}$, respectivamente.

Dessa forma, compostos bioativos isolados e matrizes poliméricas comestíveis podem ser agregados a probióticos para compor formulações nutracêuticas (Reque & Brandelli, 2021). Contudo, a viabilidade e atividade metabólica das células de probióticos podem ser prejudicadas devido às etapas de processamento, armazenamento e passagem pelo trato

gastrointestinal humano (Figura 2). Nesse contexto, alguns estudos mostram que o uso da liofilização, agregado aos compostos fenólicos presentes na matriz alimentar, pode minimizar o estresse causado nas cepas probióticas mantendo sua viabilidade (Ge *et al.*, 2024).

Figura 2 - Administração oral, disponibilidade e interações dos probióticos e fenólicos presentes na formulação nutraceutica.



Fonte: Adaptado de Dangi *et al.* (2023).

2.2 JABUTICABA (*Myrciaria jaboticaba* (vell) Berg)

A jabuticabeira é uma planta nativa do Brasil, pertencente à família Myrtaceae, encontrada, principalmente, na região de Mata Atlântica, mas também está distribuída no Paraguai e Argentina, com florescência ocorrendo nos meses de março e setembro (Albuquerque *et al.*, 2020; Calloni *et al.*, 2021). Geralmente, é uma árvore pequena, na qual as flores e os frutos crescem diretamente no tronco e galhos (Figura 3). Quando maduros, as jabuticabas apresentam casca roxa e polpa branca de sabor adocicado, textura gelatinosa (Calloni *et al.*, 2021) e ligeiramente ácido (pH ~ 4,5), sendo fonte de compostos fenólicos, como delphinidina-3-*O*-glicosídeo, cianidina-3-*O*-glicosídeo, ácido gálico e ácido elágico (Faller *et al.*, 2023).

Anteriormente, a jabuticaba era classificada no gênero *Myrciaria*, mas em 1985 foi reclassificada no gênero *Plinia* devido às suas inflorescências e características de crescimento. No entanto, o termo *Myrciaria* ainda é usado em campos científicos e ambos os termos de gênero podem ser considerados sinônimos (Danner *et al.*, 2007; Baseggio *et al.*, 2018). As principais espécies naturalmente distribuídas e cultivadas em território brasileiro são *Plinia trunciflora*, *P. cauliflora* e *P. jaboticaba* (Calloni *et al.*, 2021).

Figura 3 - Jabuticabeira com frutos maduros



Fonte: Autoria própria

No Brasil, a produção anual de jabuticaba atinge aproximadamente 5 mil toneladas no comércio formal (Massa *et al.*, 2020), sendo considerada uma fruta bastante consumida na forma *in natura*. No entanto, o cultivo comercial é limitado a algumas regiões, principalmente devido ao tempo de colheita relativamente curto (Neves *et al.*, 2021) e alta perecibilidade da fruta, com curta vida útil pós-colheita (Pellegrino *et al.*, 2024). Essa alta perecibilidade pode ser minimizada pela redução da água livre por meio de processos de secagem, como a liofilização, necessário para conservação e melhor aproveitamento dos nutrientes (Donno *et al.*, 2025; Fernandez-Pan *et al.*, 2023). Dessa forma, sua comercialização está mais distribuída na forma de produtos, como geleia (Oliveira *et al.*, 2024), suco (Martins *et al.*, 2024), xaropes, vinho (Macêdo *et al.*, 2021) e outras bebidas alcoólicas. O valor nutricional da jabuticaba tem despertado interesse crescente dos consumidores pela fruta, que se destaca, principalmente, pelo seu conteúdo de carboidratos, vitaminas, fibras dietéticas, minerais e compostos fenólicos (Seguenka *et al.*, 2024; Lima *et al.*, 2023; Martins *et al.*, 2021).

No entanto, a maior parte dos compostos fenólicos da jabuticaba concentra-se na casca e sementes, que geralmente são descartados sem qualquer aproveitamento (Barroso *et al.*, 2024; Lemos *et al.*, 2024), e juntos correspondem a cerca de 50% do peso da fruta (Coelho *et al.*, 2024). Esses subprodutos da jabuticaba concentram, principalmente, fibras solúveis e insolúveis (Nascimento *et al.*, 2024), β -caroteno (Albuquerque *et al.*, 2020), antocianinas, a exemplo da cianidina 3-*O*-glicosídeo e delphinidina-3-glicosídeo, ácido gálico, hesperidina, catequina, epicatequina 3-galato, procianidina, resveratrol e rutina (Massa *et al.*, 2020). A cianidina 3-*O*-glicosídeo é considerado o principal composto fenólico presente na jabuticaba (280 mg/100 g de peso seco), assim como em algumas de suas frações, como casca (1261 mg/100 g de peso seco), sementes (58 mg/100 g de peso seco) e resíduo despolpado (707 mg/100g de peso seco) (Inada *et al.*, 2015). Essa composição tem atraído a atenção dos pesquisadores para uso da jabuticaba como matéria prima na indústria de alimentos e farmacêutica (Mattos *et al.*, 2022).

Quadro 1 - Estudos sobre a utilização dos subprodutos da jabuticaba e seus principais efeitos

Referência	Material utilizado	Principais resultados
Faller <i>et al.</i> (2023)	Farinha da casca e semente	Melhorou a composição de fibras e compostos fenólicos em pães integrais adicionados de farinha da casca e semente da jabuticaba
Pinto <i>et al.</i> (2023)	Extrato da casca	Ao longo do armazenamento, houve redução no teor de antocianinas e viscosidade dos iogurtes.
Barroso <i>et al.</i> (2022)	Casca	Tratamento hidrotérmico com temperatura de 60 °C aplicado na casca da jabuticaba resultou em maior rendimento de cianidina-3- <i>O</i> -glicosídeo (1,88 mg/g).
Gomes <i>et al.</i> (2020)	Extrato do subproduto	O revestimento formulado com o extrato do subproduto da jabuticaba e quitosana controlaram a podridão em mamão causada por <i>Lasiodiplodia</i> spp.
Calloni <i>et al.</i> (2021)	Extrato aquoso da casca	Redução nos níveis séricos de colesterol total e triglicerídeos em ratos diabéticos.
Santos <i>et al.</i> (2023)	Extrato da casca	O extrato da casca exibiu atividade antioxidante semelhante ao nitrito de sódio quando adicionado a salsichas tipo Bolonha.
Castangia <i>et al.</i> (2021)	Extrato da casca	O extrato adicionado em vesículas fosfolipídicas apresentou maior estabilidade durante armazenamento e melhores atividades benéficas comparado ao extrato livre.

A indústria de processamento de alimentos gera uma quantidade de subprodutos que muitas vezes são depositados no ambiente e criam considerável poluição ambiental (Rosa *et al.*, 2023). No entanto, os subprodutos (casca e sementes) resultantes do processamento de frutas são fontes de nutrientes e compostos bioativos, como compostos fenólicos, fibras

alimentares, pigmentos, peptídeos e ácidos graxos polinsaturados (Hadidi *et al.*, 2024), com potencialidade funcional e que podem agregar valor a outros alimentos, além de minimizar o desperdício quando reinseridos na cadeia produtiva de alimentos e de outros produtos aplicados à saúde (Nyakang'i *et al.*, 2023; Wang *et al.*, 2023; García-Chacón *et al.*, 2024).

Esses subprodutos podem servir como insumos biotecnológicos para o desenvolvimento de novos produtos alimentícios e farmacêuticos, sendo, entretanto, a sua utilização condicionada a comprovação de segurança toxicológica (Rodríguez *et al.*, 2021). De acordo com Albuquerque *et al.* (2020), o extrato da jabuticaba não apresentou hepatotoxicidade, indicando a possibilidade de sua aplicação na indústria. De acordo com relatos na literatura, a casca da jabuticaba é considerada uma alternativa no controle da oxidação lipídica em produtos cárneos (Silva *et al.*, 2025), e dessa forma, a aplicação de tecnologias adequadas resulta na transformação desses subprodutos em produtos de valor agregado, permitindo seu redirecionamento no contexto da economia circular (Barroso *et al.*, 2023; Aït -Kaddour *et al.*, 2024). A preocupação com a sustentabilidade e o desperdício tem impulsionado as indústrias alimentícias transformar seu papel na sociedade em relação aos subprodutos gerados (Wibisono *et al.*, 2025). A utilização desses subprodutos gera novas oportunidades econômicas e inovação no setor produtivo, minimizando os prejuízos ambientais (Pal *et al.*, 2024).

Considerando a composição nutricional, alta perecibilidade da fruta e com o objetivo de minimizar as perdas de composição nutricional (Dal Castel *et al.*, 2023), atrelado ao baixo consumo dos subproduto do processamento da jabuticaba, o uso de tecnologias de processamento, como secagem e extração pela indústria, podem permitir o desenvolvimento de novos ingredientes utilizados para formular novos alimentos ou nutracêuticos, minimizando o acúmulo desses subprodutos no ambiente (Fidelis *et al.*, 2021; Ramachandran *et al.*, 2024; Shah *et al.*, 2022).

2.3 COMPOSTOS FENÓLICOS: CONCEITO E BIOACESSIBILIDADE

Os compostos fenólicos representam um grande grupo de metabólitos secundários em plantas (Lopes *et al.*, 2024), responsáveis pela pigmentação e adstringência, que atuam na proteção contra a luz ultravioleta e possuem atividade antioxidante e outros benefícios à saúde (Resende *et al.*, 2023). Esses compostos são formados a partir de um ou mais anéis aromáticos, nos quais um ou dois grupos hidroxila estão presentes (Delgado *et al.*, 2023). Suas estruturas podem variar de acordo com o número de anéis aromáticos e elementos ligados a esses anéis,

sendo, portanto, divididos em quatro classes: ácidos fenólicos, flavonóides, estilbenos e lignanas (Bié *et al.*, 2023; Beslo *et al.*, 2023; Bolat *et al.*, 2024).

Os compostos fenólicos não podem ser produzidos pelos animais, portanto, precisam ser incorporados na dieta. São amplamente distribuídos em frutas, vegetais, mel, cereais, sementes e bebidas, apresentando-se ligados a outras moléculas, como açúcares, proteínas, lipídios ou outros compostos (Siddiqui *et al.*, 2023). Sua síntese ocorre naturalmente durante o desenvolvimento dos vegetais, mas também em resposta a situações distintas, como estresse e radiação ultravioleta. Os compostos fenólicos estão relacionados às características sensoriais e estabilidade química de alimentos, e, frequentemente, a sua ingestão regular tem sido associada com benefícios à saúde, como redução do risco de doenças crônicas não-transmissíveis causadas pelo estresse oxidativo (Pasquet *et al.*, 2024; Carvalho *et al.*, 2024), inibição de lipases pancreáticas em indivíduos com obesidade (Sosnowska; Podsedek; Zucharska, 2022) e da oxidação lipídica em alimentos (Santos *et al.*, 2023). Estudo com extrato da jabuticaba relatou a capacidade de evitar o excesso de peso e adiposidade, intolerância à glicose, hipercolesterolemia e acúmulo de lipídios hepáticos em ratos com obesidade (Moura *et al.*, 2021).

A atividade antioxidante dos compostos fenólicos tem sido relacionada a sua capacidade de eliminar radicais por meio da doação de elétrons (Lang *et al.*, 2024; Hassanpour, Doroudi *et al.*, 2023). No entanto, seu efeito antioxidante depende da sua estabilidade em condições fisiológicas, assim como do número e disposição dos grupos hidroxilas na molécula. Ademais, a atividade antioxidante de compostos fenólicos é associada com outras propriedades biológicas, tais como anti-inflamatória, antimicrobiana, antiproliferativa, cardioprotetora, neuroprotetora (Duque-Soto *et al.*, 2023; Liu *et al.*, 2023), anti-envelhecimento, antitrombótica, moduladora da morte celular e de redução da viabilidade e proliferação dos adipócitos (Rahman *et al.*, 2022; Un Nisa *et al.*, 2024).

Contudo, os efeitos *in vivo* dos compostos fenólicos dependem da sua absorção e metabolismo no trato gastrointestinal. Estima-se que 5 - 10% da ingestão total de compostos fenólicos podem ser absorvidos no intestino delgado, sendo hidrolisados e biotransformados nos enterócitos e posteriormente nos hepatócitos. A maior parte atinge o lúmen do intestino grosso e é metabolizado pela microbiota intestinal, favorecendo a biodisponibilidade dos compostos fenólicos (Beslo *et al.*, 2023; Alves *et al.*, 2023). Assim, é importante considerar a bioacessibilidade dos compostos fenólicos, visto que a porção que consegue atravessar a parede intestinal torna-se bioacessível, exercendo efeitos sistêmicos no organismo em decorrência da sua bioatividade (Bié *et al.*, 2023; Subbiah *et al.*, 2024). Portanto, a simulação da digestão

gastrointestinal *in vitro* é uma alternativa bastante difundida para avaliar a biodisponibilidade e mudanças estruturais dos nutrientes (Cuvas-Limon *et al.*, 2022). Porém, a biodisponibilidade e bioacessibilidade desses compostos são afetadas por vários fatores, como solubilidade em água, ação enzimática, pH, técnicas de preparo do alimento e interações químicas com outros compostos e moléculas presentes na matriz alimentar (Li *et al.*, 2023; Qin *et al.*, 2023; Bolate *et al.*, 2024). Estudo com bebida láctea adicionada de fenólicos isolados de casca de jabuticaba indicou que a bioacessibilidade desses compostos foi reduzida ao final da digestão gastrointestinal simulada (Coelho *et al.*, 2024).

Os compostos fenólicos podem ser obtidos a partir do consumo de alimentos, fármacos e nutracêuticos. No entanto, o processo de extração é o primeiro e o mais importante método de recuperação de compostos fenólicos na matriz vegetal. A eficiência da extração é diretamente afetada pela aplicação e tempo de sonicação, polaridade do solvente, temperatura aplicada e pH (Barros *et al.*, 2020; Demircan; Velioglu; Giuffré, 2023). No entanto, os compostos fenólicos podem apresentar-se instáveis quando em contato com as condições ambientais e de processamento industrial.

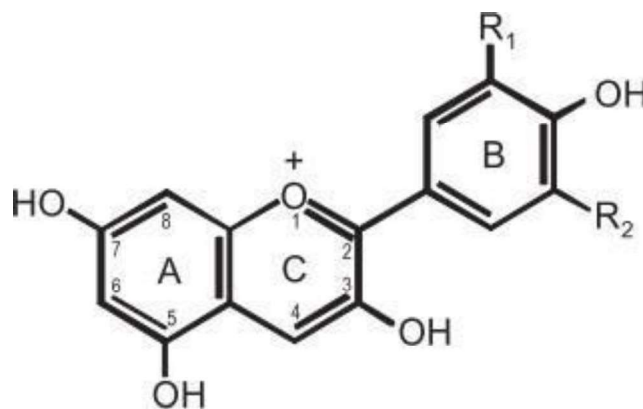
2.3.1 Antocianinas

As antocianinas são pigmentos naturais que pertencem à família dos flavonoides (Li *et al.*, 2023). São compostos fenólicos de estrutura química contendo dois anéis aromáticos unidos por uma estrutura com três átomos de carbono condensados por um átomo de oxigênio (Rodríguez-Mena *et al.*, 2023). Dessa forma, são constituídas por duas ou três porções, sendo a antocianidina (cianidina, delphinidina, malvidina, peonidina, petunidina e pelargonidina) localizada no centro da molécula e ligada a um grupo de açúcar ou ácido orgânico (Zhou *et al.*, 2020; Chen *et al.*, 2024). A formação estrutural das antocianinas ocorre por metilação, hidroxilação, glicosilação e acilação, permitindo versatilização das cores, o que as torna pigmentos importantes com tonalidade variando de vermelho, azul e roxo (Rodríguez-Mena *et al.*, 2023; Nabi *et al.*, 2023).

As antocianinas são consideradas polifenóis (Desai *et al.*, 2021), com funções importantes nas plantas, como coloração, interação com o ambiente e mecanismos de defesa, sendo predominantes na casca da jabuticaba. Os principais tipos de antocianinas são cianidina-3-glicosídeo, peonidina-3-glicosídeo e seu glicosídeo aglicona e delphinidina-3-glicosídeo (Liu *et al.*, 2023; Chen *et al.*, 2024; Dabravolski; Isayenkov, 2023). A presença desses compostos nas frutas e vegetais depende do estágio de maturação, de modo que enquanto a concentração

de alguns compostos fenólicos diminui ao longo do processo de maturação de frutas, as concentrações de antocianinas aumentam (Vilvert *et al.*, 2024).

Figura 4 - Estrutura química básica das antocianinas



Fonte: Souza *et al.* (2019).

Estudo realizado com a jabuticaba em diferentes estágios de maturação constatou que na fase madura os conteúdos de antocianinas monoméricas totais, frutose e glicose são maiores, o que sugere ser uma fase importante de consumo da fruta para fins de benefícios a saúde (Seraglio *et al.*, 2018). Esses compostos podem ser extraídos e utilizados no desenvolvimento de novos produtos, porém o processo de extração de fontes naturais nem sempre é fácil e viável para aplicação em escala industrial devido sua baixa estabilidade, resultante de exposição do produto ao oxigênio, elevadas temperaturas, luz, pH elevado e enzimas (Scibisz; Ziarno, 2023; Pinto *et al.*, 2023).

Contudo, considerando que as antocianinas são mais estáveis em valores de pH baixo, no processo de extração trona-se importante testar diferentes soluções ácidas (ex., ácido acético e fórmico) e valores de pH (ex., 1, 2 e 3) (Inada *et al.*, 2021). Já foi verificado que solventes polares acidificados (água, metanol, etanol, acetona ou suas misturas) são eficientes para a extração de antocianinas, bem como o uso de ácido em mistura água/etanol, devido as propriedades de polaridade das antocianinas (Jovanovic *et al.*, 2023). Sabe-se, que o ambiente ácido promove a degradação da membrana celular com aumento da interação entre o solvente e o composto, enquanto os íons de hidrogênios livres levam à estabilização do cátion flavílio, que é a forma da antocianina. Porém, as condições ideais de extração podem variar de acordo com o tipo de planta e seu perfil de antocianinas (Gençdag *et al.*, 2022; Xue *et al.*, 2024).

As antocianinas extraídas de plantas podem ser substitutas dos corantes sintéticos por suas cores atraentes, brilhantes, solubilidade em água e ausência de efeitos adversos à saúde (Câmara *et al.*, 2022). Com isso, esses pigmentos são ferramenta para melhorar a aparência e as características de produtos alimentícios e farmacêuticos. O uso de antocianinas pode atrair consumidores interessados em produtos alimentícios mais saudáveis, visto que podem tornar os alimentos naturalmente coloridos e sem a necessidade do uso de corantes sintéticos (Bhushan *et al.*, 2024; Miranda *et al.*, 2025).

As antocianinas são encontradas em maior quantidade na casca de frutas de cor escura, sendo instáveis a altas temperaturas, mudança de pH e presença de luz, os quais são fatores que podem levar à sua degradação (ElGamal *et al.*, 2023). Com isso, as indústrias de alimentos e farmacêutica têm o desafio de aumentar a estabilidade e biodisponibilidade desses compostos predominantes na casca da jabuticaba (Usman *et al.*, 2025), sendo a liofilização e armazenamento com o abrigo da luz alternativas para evitar a degradação da molécula. Assim, o preparo do liofilizado da casca da jabuticaba e armazenamento sob condições que mantenham sua estabilidade são estratégias para uso, conservação e aplicação desse material como matéria prima com valor agregado (Nascimento *et al.*, 2025; Silva *et al.*, 2024).

Estudo realizado com a casca da jabuticaba identificou a presença dos compostos fenólicos cianidina-3-*O*-glicosídeo (352,33 mg/100g), ácido elágico (163,65 mg/100g) e delphinidina-3-glicosídeo (94,99 mg/100g) (Resende *et al.*, 2023). O teor de compostos fenólicos presentes na casca da jabuticaba pode influenciar de forma positiva a capacidade desse material em atuar como carreador de culturas probióticas, causando a proteção das células bacterianas durante o processamento, armazenamento e quando expostas a condições simuladas do trato gastrointestinal (Gumus; Demirci, 2022; Loubet Filho *et al.*, 2022). Com base na composição de nutrientes e compostos fenólicos de subprodutos do processamento da jabuticaba, alguns estudos têm utilizado o subproduto da fruta em pó como ingrediente no desenvolvimento de diversos produtos, como bebida láctea (Coelho *et al.*, 2024), iogurte (Machado *et al.*, 2023) e salsichas (Santos *et al.*, 2023).

2.4 PROBIÓTICOS: CONCEITO E TÉCNICAS DE VIABILIDADE

Os probióticos são atualmente conceituados como “microrganismos vivos que, quando consumidos em quantidade adequada, conferem benefício à saúde do hospedeiro” (Hill *et al.*, 2014). Para exercer sua atividade em alimentos e nutracêuticos, as culturas probióticas devem estar em quantidade adequada e viáveis, permitindo-lhes resistir às condições adversas do trato

gastrointestinal e alcançar o intestino em dose suficiente para efetivamente promover os benefícios alegados ao hospedeiro (Ribeiro *et al.*, 2020).

No entanto, outras características devem ser observadas antes de atribuir a designação de probiótico a cepas de microrganismos, tais como: segurança para o consumidor (suscetibilidade a antibióticos, atividade hemolítica e degradação de mucina), funcionalidades fisiológicas (tolerância a sais ácidos e biliares, desconjugação do sal biliar, hidrofobicidade da superfície celular, autoagregação, coagregação com patógenos e atividade antagônica contra patógenos) e capacidade de sobreviver à exposição às condições gastrointestinais (Garcia *et al.* 2016; Mendonça *et al.*, 2023). Além disso, é importante avaliar as propriedades tecnológicas, tais como atividade proteolítica e lipolítica, tolerância ao NaCl, produção de expolissacarídeos e diacetil, que podem influenciar na qualidade do produto ao qual o probiótico é incorporado (Athayde *et al.*, 2024; Pourjafar *et al.*, 2023).

A maioria dos microrganismos probióticos atualmente comercializados se originam do trato gastrointestinal humano (Lau; Quek, 2024). Porém, nos últimos anos tem crescido o número de estudos com cepas potencialmente probióticas oriundas de fontes distintas, como frutas, vegetais e subprodutos do seu processamento (Araújo *et al.*, 2024a). As adaptações naturais às características intrínsecas dessas matrizes, a exemplo da acidez e presença de compostos fenólicos, possivelmente influenciam positivamente a sobrevivência dessas cepas durante o processamento e armazenamento de alimentos, particularmente em matrizes não-lácteas (Salas-Millán; Aguayo *et al.*, 2024; Payne *et al.*, 2024).

O gênero *Lactobacillus* é o mais estudado no grupo de bactérias lácticas (BAL), sendo cepas de suas espécies comumente reconhecidas como potencialmente probióticas. Recentemente, esse gênero passou por uma reclassificação taxonômica, na qual a espécie *Lactobacillus fermentum* foi renomeada como *Limosilactobacillus fermentum*, sendo caracterizada como Gram-positivo, em forma de bastonetes, heterofermentativos e anaeróbio ou aerotolerante, podendo ser encontrada em cereais fermentados, subprodutos do processamento de frutas, laticínios, esterco, esgoto e fezes humanas (Rodríguez-Sojo *et al.*, 2021; Freire *et al.*, 2021). Pesquisa realizada por Garcia *et al.* (2016) isolou e caracterizou cepas de BAL derivadas de frutas e subprodutos do processamento de frutas. As cepas *L. fermentum* 139, *L. fermentum* 296 e *L. fermentum* 263 isoladas de manga (*Mangifera indica* L.), abacaxi (*Ananas comosus*) e morango (*Fragaria vesca* L), respectivamente, destacaram-se como candidatos para uso como probióticos. Em testes *in vitro* para averiguar a segurança, funcionalidade fisiológica e propriedades tecnológicas realizados por Albuquerque *et al.* (2018), foi confirmado que as cepas *L. fermentum* 139, 263 e 296 possuem características de

segurança, funcionalidade fisiológicas e tecnológicas importantes para serem utilizadas como probióticos.

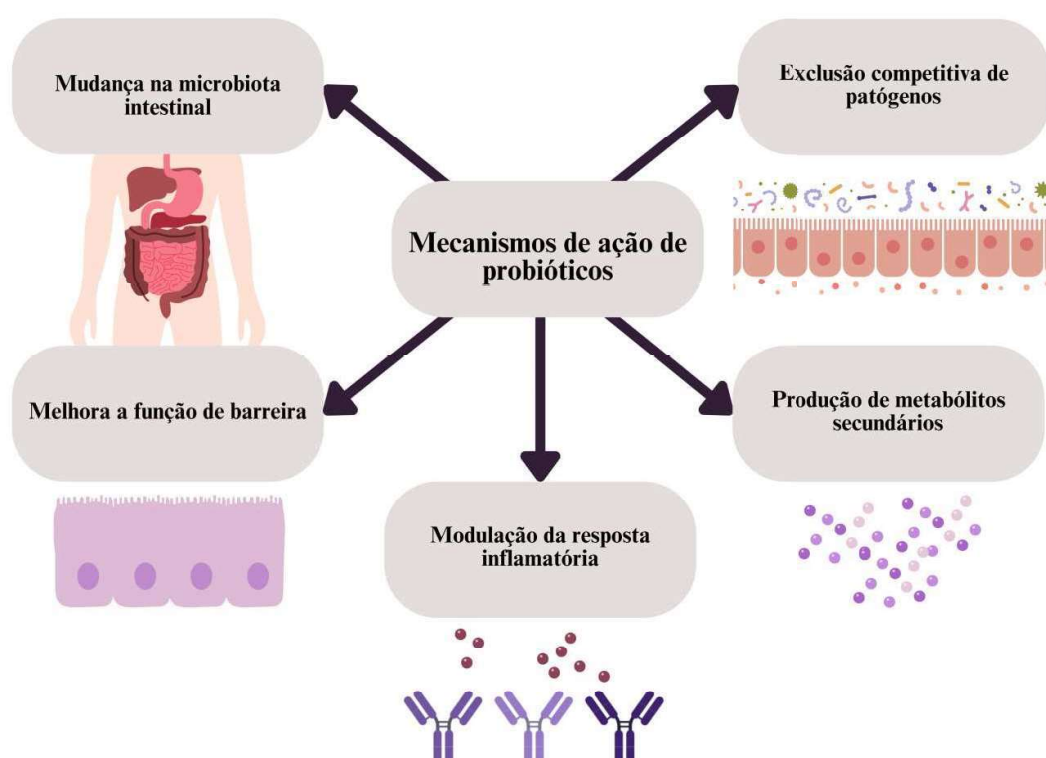
Resultados de estudo *in vivo* com ratos machos Wistar utilizando formulação mista composta pelas cepas de *L. fermentum* 296, 263 e 139 atrelada a uma dieta hiperlipídica, mostraram que os animais que receberam a formulação duas vezes ao dia, durante 4 semanas, tiveram redução de hiperlipidemia e hiperglicemia, com aumento no conteúdo sérico de HDL-c (lipoproteína de alta densidade) (Freire *et al.*, 2021). Essa cultura mista também foi estudada em relação a sua segurança por meio de avaliação de genotoxicidade (ensaio de micronúcleo) e toxicidade subcrônica (com uso de dose repetida durante 13 semanas) em ratos machos e fêmeas com 70 dias de vida. A administração da formulação não causou alteração na frequência de micronúcleos nos eritrócitos em doses de até 10^{10} UFC/ml, e, para toxicidade subcrônica, a dose administrada não causou alterações no comportamento, parâmetros bioquímicos e aparecimentos de tumores. Também foi observado que o grupo de animais que receberam doses de 10^{10} UFC/ml foi capaz de reduzir os níveis séricos de citocinas pró-inflamatórias (Cruz Neto *et al.*, 2023).

Além disso, um estudo com ratos machos Wistar avaliou os efeitos da administração de *L. fermentum* 296 em distúrbios cardiometabólicos induzidos por dieta hiperlipídica. Os animais foram separados em três grupos distintos: controle, suplementado com dieta hiperlipídica e suplementado com dieta e administração da cultura probiótica. Essa cultura (aproximadamente 1×10^9 UFC/mL) foi administrada durante quatro semanas consecutivas por meio de gavagem oral. Os animais que receberam a cultura apresentaram redução da pressão arterial e hiperlipidemia. Ainda, a contagem de células viáveis de *Lactobacillus* ssp. diminuiu nas fezes dos animais que receberam a dieta hiperlipídica, enquanto aumentou nas fezes dos animais que receberam a administração da cultura (Cavalcante *et al.*, 2019).

A cultura mista de *L. fermentum* 139, 263 e 296 também foi administrada durante quatro semanas em ratos alimentados com dieta hiperlipídica. Os animais que fizeram consumo da dieta hiperlipídica apresentaram melhora do perfil lipídico, aumento da resistência à insulina, melhora do tônus simpático e da pressão arterial, com alteração na composição da microbiota intestinal. No grupo que recebeu a cultura mista ocorreu redução da abundância de *Proteobacteria* e *Epsilonbacteraeota* comparado ao grupo controle sem consumo da dieta hiperlipídica, e aumento da abundância de *Firmicutes* em relação ao grupo com consumo da dieta hiperlipídica, porém sem administração da cultura. Os autores atribuíram à administração da cultura probiótica aos efeitos positivos na modulação da microbiota intestinal e melhora dos parâmetros relacionados a distúrbios cardiometabólicos (Ferreira *et al.*, 2022).

A administração de cepas probióticas isoladas (figura 5) ou combinadas na forma de cultura mista pode exercer efeitos promotores da saúde por meio de diferentes mecanismos, como o equilíbrio da microbiota intestinal, produção de ácidos graxos de cadeia curta, resistência à colonização e eliminação competitiva de patógenos (Freire *et al.*, 2021). O efeito antioxidante gerado por espécies de lactobacilos probióticas tem sido relacionado a moléculas de exopolissacarídeos, que também são produzidas e secretadas durante o crescimento desses microrganismos (Zhou *et al.*, 2023; Netrusov *et al.*, 2023; Pourjafar *et al.*, 2022). Os exopolissacarídeos são polímeros de carboidratos com alto peso molecular com elevado número de grupos funcionais, como hidroxila, carbonila, carboxila, acetato etc., que conferem uma série de propriedades importantes, destacando a formação de biofilmes e adesão celular e efeito antioxidante de forma indireta por meio da regulação da composição da microbiota (Garmasheva *et al.*, 2024; Aditya *et al.*, 2022).

Figura 5 – Mecanismos de ação de microrganismos probióticos.



Fonte: Adaptado de Raheem *et al.* (2021).

A aplicação industrial de bactérias probióticas é um desafio, uma vez que depende de tecnologias capazes de preservar a viabilidade e concentração das células de forma a garantir a estabilidade do produto no qual foram inseridas (Mafaldo *et al.*, 2022). Dessa forma, a liofilização é o processo bastante utilizado para reduzir o teor de umidade de culturas de probióticos e assim facilitar o transporte e viabilidade. Ela é considerada um método controlado para desidratação de produtos termolábeis, possibilitando produzir pós com estabilidade de armazenamento prolongado, a fim de permitir sua incorporação em alimentos ou na forma de nutracêuticos (Ge *et al.*, 2024; Ward; Matejtschuk, 2021).

A liofilização é um processo de secagem com determinadas vantagens, visto que possibilita preservar os nutrientes e as características dos alimentos. O método consiste em congelamento do produto (aproximadamente -57°C), seguido por sublimação da água, resultando na substância seca (Almeida *et al.*, 2020; Ge *et al.*, 2024). Mesmo sendo considerado um processo adequado para preservação de cepas probióticas, os cristais de gelo formados durante o congelamento podem causar danos na estrutura, função e composição das membranas celulares. Dentre as alterações que podem ocorrer, destacam-se desnaturação e inativação de proteínas e enzimas, resultando em diminuição da viabilidade e da atividade metabólica, levando a dano e morte celular (Sanchez *et al.*, 2023)

Algumas matrizes têm sido usadas para minimizar os danos e perda de viabilidade dos probióticos durante a liofilização, atuando como crioprotetores, como β -glucanos (Guedes *et al.*, 2019), biomassas de algas (Mafaldo *et al.*, 2022), resíduo da casca da jabuticaba (Silva *et al.*, 2023), quercetina e resveratrol (Sampaio *et al.*, 2021), tendo como destaque os fruto-oligossacarídeos (FOS). O mecanismo de proteção exercido por esses agentes crioprotetores envolve aumento da temperatura de transição vítrea, com formação de uma estrutura amorfa, e formação de ligações de hidrogênio com as proteínas de membrana (Noufeu *et al.*, 2025). No desenvolvimento de nutracêuticos compostas por quercetina, resveratrol, FOS e cepas probióticas, foi verificado que houve elevação da temperatura de transição vítrea comparado com formulações contendo apenas o FOS e as cepas. Os autores relataram que possivelmente a complexação do FOS com esses compostos retardou o aparecimento de estrutura com aspecto de borracha (*rubery state*) (Nascimento *et al.*, 2022).

Estudo prévio verificou que os subprodutos do processamento de acerola, caju e goiaba foram capazes de exercer função crioprotetora frente cepas probióticas de lactobacilos quando submetidas ao processo de liofilização e durante o armazenamento. Os autores mencionaram que, possivelmente, essa função esteve atrelada aos elevados teores de compostos fenólicos presentes nos subprodutos testados (Araújo *et al.*, 2020). Além disso, os resultados apontam

para uma possível destinação de valor agregado para esses materiais como veículos para probióticos. Contudo, são poucos os estudos que avaliam a utilização de frações ou subprodutos de frutas em ensaios de avaliação da estabilidade de cepas probióticas submetidas ao processo de liofilização e suas interações em nutracêuticos durante o processamento e armazenamento.

2.4.1 Interação entre compostos fenólicos e probióticos

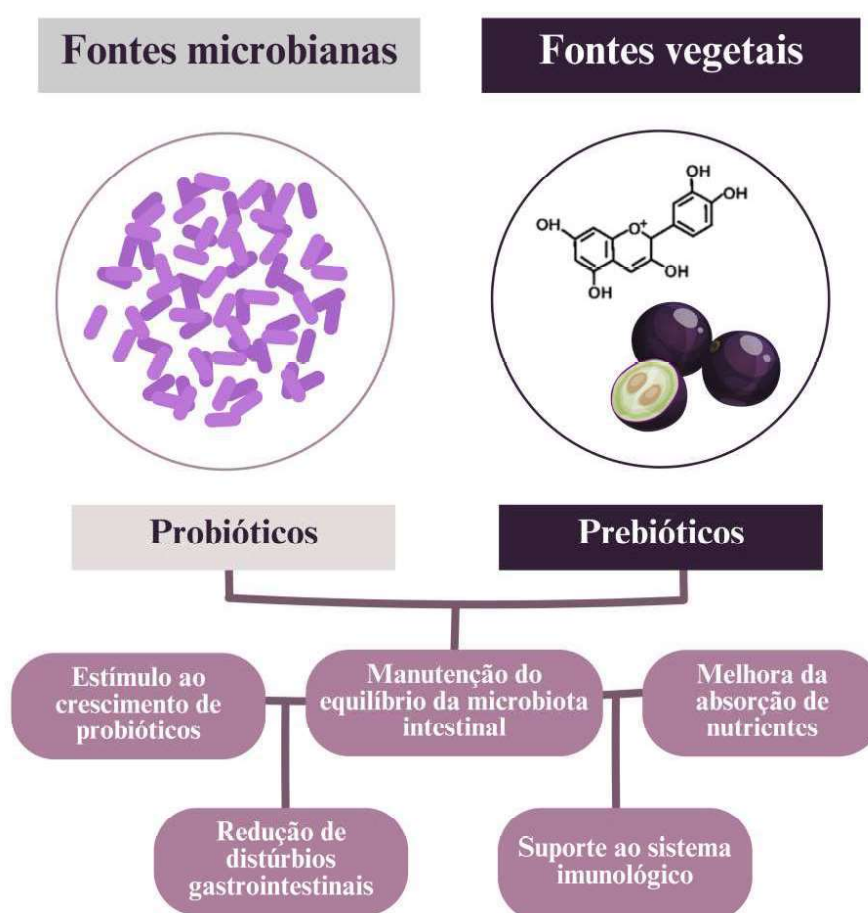
As interações entre os compostos fenólicos e microrganismos probióticos são importantes para que ambos desempenhem os efeitos benéficos à saúde humana (Figura 6). A influência dos compostos fenólicos na saúde depende da quantidade disponível na dieta, biodisponibilidade e atividade biológica dos metabólitos produzidos no trato gastrointestinal (Makarewicz *et al.*, 2021; Soares *et al.*, 2021). Portanto, podem exercer benefícios em nível local, quando atuam diretamente na passagem pelo trato gastrointestinal, bem como em nível sistêmico após absorção dos seus metabólitos. Esses compostos podem favorecer a adesão, crescimento e viabilidade dos microrganismos no ambiente intestinal (Matsumura *et al.*, 2023).

Os compostos fenólicos podem ser adicionados juntos às bactérias probióticas na formulação de nutracêuticos com a finalidade de promover proteção a estes microrganismos contra danos oxidativos. Ainda, os compostos fenólicos podem ser utilizados por probióticos por meio da ação de enzimas que liberam os compostos fenólicos presentes na parede celular das células vegetais, favorecendo a biodisponibilidade desses compostos (Zhou *et al.*, 2023). Estudos têm evidenciado o papel da presença conjunta de bactérias probióticas e compostos fenólicos em nutracêuticos. Sampaio *et al.* (2021) desenvolveram e avaliaram *in vitro* nutracêuticos compostos pelas cepas de *L. fermentum* 139, 263 e 296, quercetina e resveratrol, com base na sua estabilidade durante o armazenamento e durante exposição a condições simuladas do trato gastrointestinal (TGI). Foram detectadas contagens de células viáveis maiores que 9 log UFC/mL até 90 dias de armazenamento sob refrigeração, enquanto sob temperatura ambiente houve reduções significativas nas contagens das três cepas avaliadas. Também foi observado que QUE e RES protegeram as células de *L. fermentum* durante a exposição ao TGI simulado.

As antocianinas, assim como os demais flavonoides, são metabolizadas pela microbiota intestinal ou por microrganismos probióticos, ocasionando a degradação estrutural e transformação com liberação de metabólitos bioativos (Rosales *et al.*, 2022). Por sua vez, as antocianinas percorrem a mucosa gástrica e no intestino delgado, especialmente no jejuno, são metabolizadas pelas agliconas. A porção não absorvida no cólon sofre ação da β -glicosidase

presente em bactérias da microbiota intestinal (Verediano *et al.*, 2021). As porções não absorvíveis dos compostos fenólicos permanecem disponíveis no cólon e são biotransformadas pela microbiota intestinal, resultando em metabólitos capazes de modular a composição da microbiota intestinal, principalmente por meio da inibição de bactérias patogênicas e estimulação da população de bactérias intestinais benéficas, incluindo probióticos (Silva *et al.*, 2023b).

Figura 6 - Combinação de cepas probióticas com fonte de compostos fenólicos



Fonte: Adaptado de Dangi *et al.* (2023)

Resultados de estudo realizado com tablete de vegetais suplementado com cepa de *Lactobacillus rhamnosus* mostraram redução no conteúdo de compostos fenólicos e da contagem de células viáveis quando o produto foi exposto a condições gastrointestinais simuladas. Ainda, foi observada oscilação na faixa de comprimento de onda que indicaram

transformação de ligações moleculares, resultando em alteração na superfície celular do probiótico. No entanto, a contagem das células viáveis permaneceu superior a 10^6 UFC/g ao longo da exposição a condições gastrointestinais simuladas (Jafari *et al.*, 2022).

Outro estudo mostrou que açúcares utilizados como excipientes no processo de liofilização de cultura de *Bifidobacterium longum* ssp. *infantis* atuaram como crioprotetores. Nesse estudo foram utilizados os prebióticos frutooligosacarídeos, celobiose, sacarose, trealose e lactose como excipientes para aumentar a estabilidade e funcionalidade de *B. infantis*. As fórmulas simbióticas com os carboidratos apresentaram aumento funcionalidade quando expostas a simulação do trato gastrointestinal. A presença de celobiose e FOS em algumas formulações foi capaz de torná-las mais estáveis quando comparada às demais. Os autores relataram que a estabilidade da cepa probiótica durante o processo de liofilização, armazenamento e condições gástricas simuladas foi alcançada devido a disponibilidade de compostos metabolizáveis, fornecidos pelos prebióticos, permitindo desenvolver diferentes mecanismos de ação, como manutenção e proteção de integridade da membrana intestinal (Basholli-Salihu *et al.*, 2019).

A administração do subproduto da jabuticaba (casca e semente) foi capaz de promover alterações na comunidade microbiana intestinal, melhora nos parâmetros metabólicos e renais induzidos por uma dieta hiperlipídica em camundongos. Após quatro semanas de suplementação de 5%, 10% e 15% do subproduto da jabuticaba houve melhora na resistência à insulina, dislipidemia e expressão do gene responsável pela lipólise hepática nos camundongos (Soares *et al.*, 2021).

Microrganismos probióticos mostraram-se capazes de causar transformação em compostos fenólicos por meio da ação de diferentes glicosil-hidrolases, enzimas que promovem a liberação de agliconas a partir de compostos fenólicos glicol-conjugados, resultando em melhor biodisponibilidade (Taverniti *et al.*, 2022). Algumas espécies bacterianas podem catalisar o *O*- e *C*- glicosídeos, que são as formas como os flavonoides estão presentes nas frutas. Essas espécies de glicosídeos geralmente sofrem desglicosilação antes de sua absorção. A desglicosilação por ação das bactérias intestinais já foi relatada para glicosídeos de flavonas, flavanonas, isoflavonas e antocianidinas. Espécies de bifidobactérias e lactobacilos também são capazes de separar a porção de glicose (Verediano *et al.*, 2021).

Além de possíveis benefícios à saúde, os subprodutos do processamento de frutas, reconhecidos como fontes de diferentes compostos, têm sido investigados em relação a sua ação crioprotetora a fim de diminuir a ocorrência de danos e perda de viabilidade nas células probióticas durante a liofilização e passagem pelo trato gastrointestinal, como também de

exercer os efeitos benéficos após metabolização pela microbiota (Centurion *et al.*, 2022; Rashidinejad *et al.*, 2022). Subprodutos de acerola e goiaba junto com cepas probióticas de *Lactobacillus* e *Lacticaseibacillus* foram capazes de aumentar a abundância relativa de grupos bacterianos benéficos e induzir a atividade metabólica da microbiota intestinal humana, possivelmente devido a contagem de células viáveis $>9 \log \text{ UFC/g}$ e intenso metabolismo de glicose, frutose, maltose e ramnose, resultando em liberação de ácidos orgânicos e redução do pH, favorecendo a absorção de nutrientes e inibição do crescimento de microrganismos patógenos (Araújo *et al.*, 2024b).

Geralmente, os crioprotetores, como aminoácidos, proteínas, glicerol, lactose e FOS, são utilizados para desempenhar essa função. Acredita-se, que os açúcares podem substituir as moléculas de água durante a desidratação e manter as estruturas biológicas em condição hidratadas; ou os açúcares formam matrizes vítreas nas quais a alta viscosidade aliada à baixa mobilidade molecular restringem as interações moleculares (Bakó *et al.*, 2024; Araújo *et al.*, 2024b). Pesquisa realizada com o liofilizado do fruto do mandacaru mostrou-se um potencial efeito crioprotetor durante o processo de liofilização e armazenamento refrigerado de bactérias ácido lácticas (Medeiros *et al.*, 2024).

Os probióticos podem ser incorporados em matrizes poliméricas comestíveis, representando uma fonte de compostos bioativos, resultando em formulação nutracêutica (Reque; Brandelli, 2021). Contudo, a viabilidade e atividade metabólica das cepas podem ser prejudicadas devido às etapas de processamento, armazenamento e passagem pelo trato gastrointestinal humano (Camelo-Silva *et al.*, 2022; Manassi *et al.*, 2022; Bustos *et al.*, 2024). Nesse contexto, alguns estudos mostram que o uso da liofilização, agregado aos compostos fenólicos presentes na matriz alimentar, podem minimizar o estresse causado nas cepas probióticas (Basholli-Salihi *et al.*, 2019).

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 OBTENÇÃO E HIGIENIZAÇÃO DA MATÉRIA PRIMA

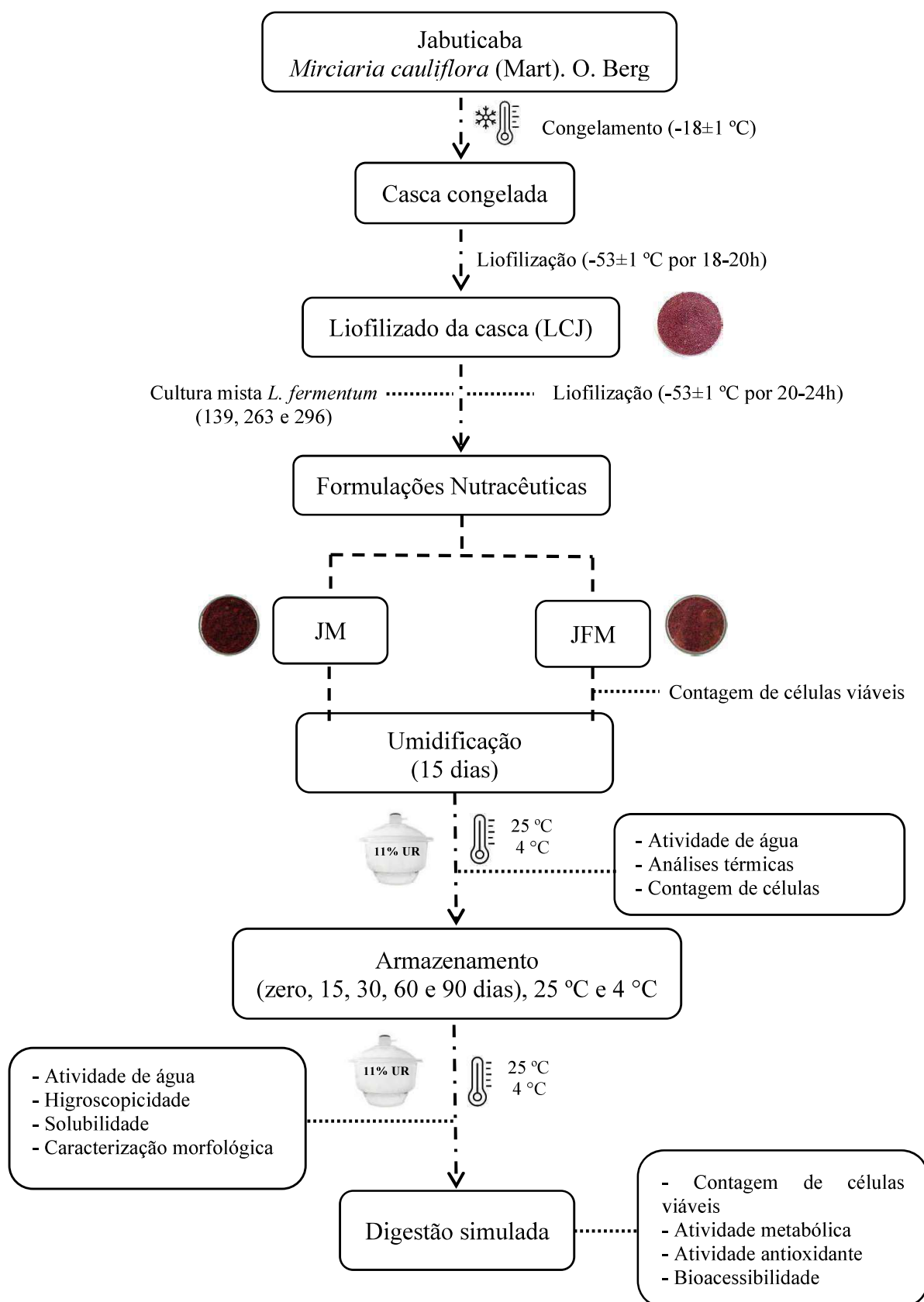
O estudo foi realizado com amostra de jabuticaba cultivar Sabará [*Myrciaria cauliflora* (Mart) O. Berg], adquiridas no Engenho Várzea do Coaty, localizado na cidade de Areia – PB - Brasil. Os frutos foram colhidos manualmente no mês de janeiro/2022, selecionados considerando integridade e estágio de maturação e transportados em caixa térmica contendo gelo para o Laboratório de Microbiologia e Bioquímica de Alimentos (LMBA)/Departamento de Nutrição/CCS/UFPB.

No laboratório, os frutos foram lavados em água corrente para remoção de sujidades, e, posteriormente, foram higienizados em solução de hipoclorito de sódio (200 ppm) por 15 minutos, seguido por enxague em água potável corrente. Os frutos foram despulpados manualmente, as cascas foram separadas da polpa e caroços. As cascas foram congeladas em freezer vertical sob temperatura de -18 ± 2 °C até o uso.

3.2 LOCAL DE EXECUÇÃO DA PESQUISA

Os experimentos foram realizados no Laboratório de Microbiologia e Bioquímica de Alimentos/Departamento de Nutrição/Centro de Ciências da Saúde (LMBA/DN/CCS), Laboratório de Controle de Qualidade Físico-Químico/Departamento de Ciências Farmacêuticas/Centro de Ciências da Saúde (LCQFC/DCF/CCS), Laboratório de Bromatologia/Departamento de Nutrição/Centro de Ciências da Saúde (LABROM/DN/CCS), Laboratório de Materiais e Biosistemas/Departamento de Engenharia de Materiais/Centro de Tecnologia (LAMAB/DEMAT/CT/UFPB), no Núcleo de Pesquisa de Materiais/Centro de Tecnologia (NEPEM/CT), todos localizados na Universidade Federal da Paraíba/Campus I, e no Laboratório de Alimentos Funcionais/Instituto de Nutrição Josué de Castro/Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ). O desenho experimental do estudo está apresentado na Figura 7.

Figura 7 - Desenho do estudo da estabilidade dos nutraceuticos.



Fonte: Autoria própria. LCJ, liofilizado da casca da jabuticaba; JM, nutraceutico composto pelo liofilizado da casca e cultura mista; JMF nutraceutico composto pelo liofilizado da casca, cultura mista e FOS.

3.3 ELABORAÇÃO DO LIOFILIZADO DA CASCA DA JABUTICABA (LCJ)

As cascas foram congeladas ($-20\text{ }^{\circ}\text{C}$) e secas em liofilizador de bancada (modelo L-101, marca LIOTOP, São Carlos, SP, Brasil) por um período de aproximadamente 18 - 20 horas a temperatura de $-53\text{ }^{\circ}\text{C}$ e pressão de 60 mmHG, com velocidade de 1 mm/h (Massa *et al.*, 2020). Após a liofilização, o material desidratado foi triturado durante 5 minutos em liquidificador doméstico e tamisado através de filtro fino para obter um pó com tamanho médio de partícula menor que 1 mm em peneira de malha fina. A casca liofilizada foi acondicionada em sacos metálicos, hermeticamente fechados e armazenados sob refrigeração ($5 \pm 0,5\text{ }^{\circ}\text{C}$) para ser utilizada na elaboração das formulações nutracêuticas.

Figura 8 - Etapa de obtenção do liofilizado da casca da jabuticaba



Fonte: Autoria própria. a) Casca liofilizada; b) liofilizado da casca triturado (LCJ).

3.4 PREPARAÇÃO DE CULTURA MISTA DE *L. fermentum* E CONTAGEM DE CÉLULAS VIÁVEIS

Para a preparação dos nutracêuticos foram utilizadas três cepas de *L. fermentum* (*L. fermentum* 139, *L. fermentum* 263 e *L. fermentum* 296) isoladas de subprodutos do processamento de manga, abacaxi e morango, respectivamente, e caracterizadas como candidatas para uso como probióticas (Cavalcanti *et al.*, 2019; Oliveira *et al.*, 2020; Garcia *et al.*, 2016). Os estoques das cepas foram armazenados em criotubos à temperatura de $-20 \pm 0,5\text{ }^{\circ}\text{C}$ em caldo de Mann, Rogosa e Sharpe (MRS) (HiMedia, Mumbai, Índia) contendo glicerol (Sigma-Aldrich, St. Louis, EUA; 20 mL/100 mL). Para utilização nos ensaios, cada cepa foi

cultivada em caldo de Man, Rogosa e Sharpe (MRS) (HiMedia, Mumbai, Índia) a $37 \pm 0,5$ °C por 24 - 48 horas (para alcance da fase estacionária) sob anaerobiose (AnaeroGen, Oxoid, Basingstoke, Inglaterra). Em seguida, as culturas foram centrifugadas ($4000 \times g$, 10 min, 4 °C), lavadas duas vezes com solução salina esterilizada (0,85g/100 mL) e ressuspensas em água destilada esterilizada para obter as suspensões celulares. As suspensões das três cepas foram misturadas em iguais proporções (1:1:1) para obter uma única suspensão com leitura de densidade óptica a 625 nm (DO_{625nm}) de 2,0 a 2,5, correspondendo a contagens de células viáveis de aproximadamente 11 log Unidades Formadoras de Colônias/mL (UFC/mL).

As contagens de células viáveis da cultura mista de *L. fermentum* foram determinadas antes de adicionar às formulações e compondo as formulações foram analisadas antes e após a liofilização dos nutracêuticos, após o período de umidificação e durante o armazenamento refrigerado e sob temperatura ambiente nos tempos zero, 15, 30, 60 e 90 dias em umidade relativa de 11%. Na suspensão da cultura mista, a contagem de células viáveis foi realizada por meio de diluições seriadas ($1:9$, 10^{-1} a 10^{-9}) em solução de água peptonada (0,1 % p/v). Aliquotas de 100 µL das diluições foram inoculadas em ágar MRS por meio da técnica de inoculação em superfície de placas, seguido por incubação anaeróbica (AnaeroGen®) a 37 ± 1 °C por 48 horas. Os resultados foram expressos em log UFC/mL. O limite de detecção da análise foi de 2 log UFC/g.

3.5 ELABORAÇÃO DOS NUTRACÊUTICOS

Os nutracêuticos foram elaborados considerando doses diárias de ingestão efetivas e seguras de antocianinas, sugeridas por resultados de meta-análises de ensaios clínicos, para alcançar melhora em parâmetros relacionados à obesidade, perfil lipídico e status antioxidantes em indivíduos adultos saudáveis (Yi Guo *et al.*, 2020), sendo estabelecida uma dose de 80 mg/dia. Com base no teor de antocianinas presentes no liofilizado da casca da jabuticaba (LCJ) ($612,36 \pm 10,20$ mg/100 g) foi necessário utilizar $13 \pm 0,22$ g do LCJ para elaboração do nutracêutico (Silva *et al.*, 2023a). Testes iniciais foram realizados com o LCJ e observou-se que 72 mL da cultura mista foram capazes de homogeneizar o liofilizado. Algumas formulações foram acrescidas de fruto-oligossacarídeo (FOS; contendo de 30 a 42% de 1-kestose, 45 a 57% de nistose e 5 a 15% de frutofuranosil nistose; Sigma – Aldrich®) devido seu reconhecido efeito crioprotetor para células bacterianas (Di *et al.*, 2023) na quantidade de 20% (p/v), conforme descrito por Sampaio *et al.* (2021).

As suspensões da cultura mista de *L. fermentum* foram utilizadas para preparar as duas formulações: a) cultura mista de *L. fermentum* (~72 mL) + 13 g de LCJ, denominada de JM e b) cultura mista de *L. fermentum* (~72 mL) + 13 g de LCJ + 14,4 g (20%) de FOS, denominada de JFM. As formulações foram submetidas ao congelamento a $-20\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 0,5\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 24 horas e liofilizadas em liofilizador de bancada (conforme item 3.2). Na Figura 9 pode-se visualizar as duas formulações após a liofilização.

Figura 9 - Formulações nutraceuticas após a liofilização.



Fonte: Autoria própria. a) formulação JM (cultura mista de *L. fermentum* e liofilizado da casca); b) formulação JFM (cultura mista de *L. fermentum*, liofilizado da casca e FOS).

Posteriormente a liofilização, foi realizada a contagem de células viáveis da cultura mista presente nas formulações conforme item 3.3 (Sampaio *et al.*, 2021). Todos os nutraceuticos testados iniciaram o armazenamento com contagens de células viáveis $> 9\text{ log UFC/g}$. Em seguida, os nutraceuticos foram distribuídos em placas de Petri descartáveis a $4\text{ e }25 \pm 0,5\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante 15 dias (período de umidificação) em dessecadores hermeticamente fechados sob proteção da luz, contendo solução saturada de LiCl (20 g/5 mL de água destilada) (Sigma Aldrich) para o alcance de atmosfera controlada em 11% de umidade relativa (Dai *et al.*, 2022), conferindo, respetivamente, atividade de água de 0,19 e 0,17 para JFM e JM armazenadas sob refrigeração; e 0,21 e 0,22 para JFM e JM armazenadas em temperatura ambiente após o período de umidificação. Após essa etapa, as placas foram fechadas e prosseguiu-se o armazenamento durante 90 dias sob refrigeração ($4 \pm 0,5\text{ }^{\circ}\text{C}$) e temperatura ambiente ($25 \pm 0,5\text{ }^{\circ}\text{C}$). Nos tempos estabelecidos (tempo zero, 15, 30, 60 e/ou 90 dias de

armazenamento), os nutracêuticos foram submetidos às análises de estabilidade, como análises térmicas, atividade de água, solubilidade e higroscopicidade, além da contagem de células viáveis, estado fisiológico das células bacterianas, morfologia, determinação de compostos fenólicos e atividade antioxidante.

3.6 ANÁLISE TÉRMICA DOS NUTRACÊUTICOS

Os nutracêuticos foram submetidos às análises térmicas para determinar mudanças físicas, químicas e estruturais após a liofilização e no último tempo de armazenamento (tempo 90 dias). Essas mudanças foram identificadas por meio de curvas de calorimetria exploratória diferencial (DSC) e termogravimetria (TG). As curvas de DSC foram obtidas em calorímetro modelo DSC-50 (Shimadzu, Kyoto, Japão) utilizando o software TasyS (Shimadzu). 2 mg de cada nutracêutico foi pesado em cadinho de alumínio fechado e a análise foi realizada a uma taxa de aquecimento de 10 °C/minuto até atingir 450 °C em atmosfera de nitrogênio e vazão de 50 mL/minuto. As curvas de TG foram obtidas em calorímetro modelo TGA-50 (Shimadzu) utilizando o software TasyS. 5 mg de cada nutracêutico foi pesado em cadinho de alumina e a análise foi realizada a uma taxa de 10 °C/minuto até atingir 900 °C sob atmosfera de ar sintético e vazão de 20 mL/minuto (Nascimento *et al.*, 2022).

3.7 DETERMINAÇÃO DA ESTABILIDADE DOS NUTRACÊUTICOS

Para determinação da estabilidade dos nutracêuticos foram estabelecidas as condições de transição vítrea, acompanhamento da atividade de água ao longo do armazenamento, determinação das condições de solubilidade e higroscopicidade imediatamente antes do período de umidificação e nos tempos 0, 15, 30, 60 e 90 dias de armazenamento refrigerado ($4 \pm 0,5$ °C) e temperatura ambiente ($25 \pm 0,5$ °C), bem como avaliação dos aspectos estruturais no início e final do armazenamento.

3.7.1 Atividade de água

A atividade de água foi medida imediatamente antes da etapa de umidificação e durante o armazenamento (zero, 15, 30, 60 e 90 dias) em temperatura ambiente e sob refrigeração. Para medida da atividade de água utilizou-se um higrômetro digital Aqualab 3TE (Decagon Pullman, EUA) operando sob temperatura ambiente (AOAC, 2019).

3.7.2 Determinação de solubilidade

Para determinação da solubilidade, pesou-se 1 g em base seca e acrescentou-se 100 mL de água destilada, seguindo por homogeneização (manual ou em agitador magnético????) durante 5 minutos. Posteriormente, a solução foi colocada em tubos Falcon de 50 mL e centrifugada (3000 rpm, 5 min). Uma alíquota de 25 mL do sobrenadante foi transferida para placa de Petri e seca em estufa a 105 °C durante 24 horas. Em seguida, a solubilidade (%) foi calculada pela diferença de peso antes e após a secagem, utilizando a Equação 1 (Cano-Chauca *et al.*, 2005).

$$\% \text{ Solubilidade} = \frac{MS}{MT} \times 100 \quad (1)$$

Onde: “MS” é a massa do sobrenadante e “MT” é a massa total. O resultado foi expresso em percentual (%) de capacidade de solubilidade do material.

3.7.3 Análise de higroscopicidade

A higroscopicidade foi determinada de acordo com a metodologia descrita por Cai e Corke (2000). Alíquotas de aproximadamente 1 g foram pesadas em placas de Petri, colocadas dentro de dessecador contendo solução saturada de NaCl (umidade relativa $\approx 75,29\%$ a 25 °C) e mantidas em câmara (BOD) com temperatura controlada ($25 \pm 0,5$ °C) por um período de 7 dias, pesando as amostras diariamente até atingirem o equilíbrio higroscópico. A higroscopicidade foi expressa como g de água adsorvida por 100 g de massa seca.

3.8 AVALIAÇÃO DE CARACTERÍSTICAS ULTRAESTRUTURAIS DOS NUTRACÊUTICOS

Nos tempos zero e 90 dias de armazenamento sob temperatura ambiente ($25 \pm 0,5$ °C) e refrigeração ($4 \pm 0,5$ °C), os nutracêuticos foram avaliados quanto às características estruturais por meio da técnica de microscopia eletrônica de varredura (MEV) usando microscópio eletrônico de varredura (Modelo TM-1000, Hitachi, Tóquio, Japão). Foram utilizadas tensão de aceleração de 15 kV, detector de elétrons retroespalhado, resolução espacial de até 30 nm e ampliações na faixa de 50x a 10.000x. Antes da análise de MEV, os nutracêuticos foram

metalizadas com fina camada de ouro por se tratar de material orgânico com baixa condutividade (Bora *et al.*, 2019).

3.9 AVALIAÇÃO DO ESTADO FISIOLÓGICO DA CULTURA MISTA PROBIÓTICA

3.9.1 Procedimento de coloração

O estado fisiológico das células de *L. fermentum* foi analisado no dia 15 de umidificação (dia zero) e nos demais dias do armazenamento (15, 30, 60 e 90 dias) nas temperaturas de refrigeração e ambiente e durante a exposição às condições simuladas do trato gastrointestinal utilizando a técnica da citometria de fluxo. Para isso, cada nutracêutico foi diluído em 3 mL de água deionizada esterilizada. Posteriormente, foram centrifugados (4500 x g por 10 minutos, 4 °C) e os sedimentos obtidos foram lavados duas vezes em solução salina tamponada com fosfato (PBS). O precipitado foi reidratado com 600 µL de PBS e dividido brancas e coradas. Para a coloração foi usado o iodeto de propídio (PI, Sigma-Aldrich) na concentração de 10 µg/mL e diacetato de carboxifluoresceína (cFDA, Sigma-Aldrich) na concentração de 2,5 µg/mL. Os corantes foram usados separadamente e em combinação (dupla marcação). Na presença dos corantes, os nutracêuticos foram incubados por 15 minutos no escuro. Após esse período, foram centrifugados, nas mesmas condições descritas acima, ressuspensos em PBS e submetidos à análise.

A coloração com os fluorocromos PI e cFDA destinou-se a avaliar a integridade da membrana citoplasmática e atividade respiratória/metabólica (Pedrosa *et al.*, 2020; Paparella *et al.*, 2008), respectivamente, nas células presentes nos nutracêuticos.

3.9.2 Análise em citometria de fluxo

A análise de OU EM? citometria de fluxo foi realizada em citômetro de fluxo com emissão de laser de argônio a 488 nm e 640 nm (BD Accuri C6, Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ, EUA), contendo dois detectores de dispersão de luz (FSC e SSC) e quatro detectores de fluorescência. O detector de fluorescência denominado de canal FL1 detecta luz com comprimento de onda de 533 nm ± 30 nm e foi utilizado para coletar fluorescência na cor verde para verificar marcações com cFDA. O detector de fluorescência denominado de canal FL3 detecta luz com comprimentos de onda >670 nm e foi utilizado para coletar fluorescência na

cor vermelha para verificação de marcações com PI. Para a leitura dos eventos foi utilizado os detectores de dispersão de luz. Na dispersão direta (*forward scatter*, FSC) utilizou-se o valor de 30 000 e na dispersão lateral (*side scatter*, SSC) foi utilizado o valor de 12.000 com o intuito de eliminar partículas muito menores do que as células intactas e delimitar as células bacterianas, respectivamente.

Na análise foi realizado um total de 10.000 eventos por nutracêutico com compensação automática para os dados obtidos. Dessa forma, os eventos lidos foram interpretados com base nas marcações como: a) células vivas íntegras (coradas apenas com o marcador cFDA), b) células vivas injuriadas (coradas com os marcadores cFDA e PI), c) células mortas (coradas apenas com o marcador PI), e d) artefatos (não corados com nenhum dos marcadores).

Para análise dos dados de dupla marcação foram projetados gráficos FL1 (eixo Y) versus FL3 (eixo X) com quatro quadrantes, com população celular de acordo com cada fluorescência detectada na leitura, sabendo-se que para a coloração dupla com PI e cFDA, as populações caracterizadas como PI-cFDA+ corresponderam as células vivas e estão localizadas no quadrante superior esquerdo; as populações caracterizadas como PI+cFDA- corresponderam as células com membranas permeabilizadas sem atividade metabólica (células mortas), estando localizadas no quadrante inferior direito; as populações celulares caracterizadas como PI+cFDA+ corresponderam as células permeabilizadas com atividade metabólica (células injuriadas) (Paparella *et al.*, 2008). A análise dos dados foi realizada com o software BD Accuri C6 (Becton Dickinson and Company) (Pedrosa *et al.*, 2020; Rodrigues *et al.*, 2021).

3.10 DETERMINAÇÃO DOS COMPOSTOS FENÓLICOS

A determinação de compostos fenólicos presentes nos nutracêuticos foi realizada após liofilização, durante o armazenamento (0, 15, 30, 60 e 90 dias) sob temperatura de refrigeração ($4 \pm 0,5$ °C) e ambiente ($25 \pm 0,5$ °C) (11% UR) e durante a passagem pelo trato gastrointestinal. A determinação se deteve às antocianinas (cianidina-3-glicosídeo e delfinidina-3-glicosídeo) e ácidos fenólicos (ácido elágico e ácido gálico) por serem os compostos majoritários presentes no LCJ (Inada *et al.*, 2019; Massa *et al.*, 2020). Para determinação dos compostos foi utilizada a técnica de cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) acoplada à espectrometria de massas. Foi utilizado um cromatógrafo Shimadzu equipado com duas bombas paralelas LC-20AD, injetor automático SIL-20AHT, controlador de sistema CBM-20A, desgaseificador DGU-20A5 e acoplado a um detector de arranjo de diodos (SPD-M20A). Foi utilizada coluna de fase reversa C18 (5 μ m, 150 mm $\times$ 4,6 mm, Phenomenex ®) para detecção das antocianinas

e coluna Poroshell 120 EC-C18 (2,7 μm , 100 mm $\times$ 3 mm, Agilent Technologies) para quantificação de ácidos fenólicos, conforme metodologia descrita por Inada *et al.* (2020).

Para identificação dos compostos fenólicos foi usada a comparação entre os tempos de retenção e espectro de absorção para cada padrão, sendo antocianinas (530 nm), ácido gálico (280 nm) e ácido elágico (360 nm). Os dados foram obtidos utilizando o software de solução LC (Shimadzu Corporation®, versão 1.25, 2009). Os padrões de antocianinas e ácidos fenólicos foram adquiridos, respectivamente, da Indofine Chemical Co. (Hillsborough, NJ, EUA) e da Sigma-Aldrich (St. Louis, MA, USA).

3.10.1 Determinação das antocianinas

A extração das antocianinas foi realizada em triplicata, conforme descrito por Barreto *et al.* (2021). Oitenta miligramas de cada nutracêutico foram extraídos com etanol: água: ácido fórmico frio (79:20:1, v/v/v), centrifugado (2800 x g, 5 minutos, 10 °C, Thermo Scientific Sorvall®, ST16R). O sobrenadante foi coletado e o resíduo foi reextraído duas vezes usando o mesmo procedimento. Os sobrenadantes foram combinados e o volume foi ajustado para 10 mL com solução de extração. Antes da análise por HPLC, o extrato foi filtrado através de PVDF (fluoreto de polivinilideno hidrofóbico) de 0,45 μm (Agilent Technologies).

A separação cromatográfica das antocianinas foi realizada utilizando uma coluna de fase reversa (C18, 5 μm , 250 mm $\times$ 4,6 mm, Kromasil®), conforme metodologia descrita por Inada *et al.* (2020). A fase móvel consistiu em gradiente de ácido fórmico aquoso a 1% (eluente A), ácido fórmico a 1% em metanol (eluente B) e acetonitrila (eluente C), a uma vazão de 2,0 mL/minutos. A concentração do eluente C foi mantida constante em 2% durante a análise. Antes da injeção, a coluna foi equilibrada com 18% de B. Após a injeção da amostra, a composição do solvente foi mantida constante até 2 minutos, aumentada para 32% de B em 6 minutos e para 52% de B em 8 minutos e depois diminuída para 18% de B em 18 minutos. Entre as injeções foram permitidos intervalos de 10 minutos para reequilibrar a coluna com 18% de B. As antocianinas foram monitoradas a 530 nm. Os resultados foram expressos em mg/100 g.

3.10.2 Ácidos fenólicos

A extração de ácidos fenólicos totais (solúveis e insolúveis) dos nutracêuticos foi realizada em duplicata de acordo com a metodologia descrita por Inada *et al.* (2015). Os compostos fenólicos foram extraídos durante 10 minutos com 20 mL de etanol frio a 80% e

centrifugadas (2500 rpm, 5 minutos, 10 °C). O sobrenadante foi recolhido e o resíduo extraído novamente. Os sobrenadantes foram combinados, o solvente removido e o resíduo seco reconstituído em água.

Na extração alcalina, 5 mL de solução de NaOH 10M com 12 mL de água foram adicionados a 50 mg do nutracêutico sob temperatura ambiente (25 ± 2 °C) e proteção da luz e com agitação por 16 horas. Em seguida, o pH foi ajustado para 2,0 com HCl. A mistura foi adicionada de 15 mL de acetato de etila concentrado ($C_4H_8O_2$), deixando sob repouso por 30 segundos, centrifugada (2500 rpm, 5 minutos, 10 °C) e coletado o sobrenadante. O solvente presente no sobrenadante foi removido e o resíduo seco foi misturado com metanol 80%. Posteriormente, esse resíduo foi incubado com 2,5 mL de HCl concentrado por 30 minutos referente a hidrólise ácida. Em seguida, foi repetida a extração com acetato de etila nas mesmas condições descritas acima. Os extratos resultantes foram coletados e filtrados através de um filtro de seringa PVDF de 0,45 μ m (Agilent Technologies).

A separação cromatográfica dos ácidos fenólicos foi obtida utilizando uma coluna Poroshell 120 EC-C18 (2,7 μ m, 100 mm $\times$ 3 mm, Agilent Technologies) de acordo com metodologia descrita por Inada *et al.* (2020). A identificação foi realizada por comparação com o tempo de retenção e o espectro de absorção do respectivo padrão. A quantificação foi realizada por calibração externa. Os dados foram adquiridos pelo software LabSolutions (Shimadzu Corporation®, versão 5.114, 2008–2022).

3.11 CAPACIDADE ANTIOXIDANTE DOS NUTRACÊUTICOS DURANTE O ARMAZENAMENTO

A capacidade antioxidante foi avaliada durante os intervalos de armazenamento (dia zero, 15, 30, 60 e 90) sob refrigeração ($4 \pm 0,5$ °C) e temperatura ambiente ($25 \pm 0,5$ °C) (UR 11%) por meio da eliminação do radical DPPH (2,2-difenil-1-picril-hidrazil) e da capacidade antioxidante equivalente ao trolox por meio da captura do radical 2,2-azino-bis(3-etilbenzotiazolina)-6-ácido sulfônico (ABTS^{•+}). O poder antioxidante para a redução do complexo TPTZ (2,4,6-tri(2-piridil)-1,3,5-triazina) com Fe^{3+} no ensaio de FRAP.

3.11.1 Obtenção dos extratos

Os extratos foram obtidos por meio de hidrólise ácida de acordo com a metodologia descrita por Massa *et al.* (2020) com adaptações. Inicialmente, pesou-se 2 g do nutracêutico e diluiu em 10 mL de solução extratora de etanol 70% (70:30, v/v) com ajuste de pH em 2,0 com HCl a 1 M. A mistura foi mantida em tubo Falcon de 50 mL envolto em papel alumínio para abrigo da luz e armazenado sob refrigeração ($4 \pm 0,5$ °C) por 24 horas. Posteriormente, os tubos foram centrifugados (4000 rpm, 10 minutos, 4 °C) e o sobrenadante foi utilizado para as análises.

3.11.2 Capacidade antioxidante – Método DPPH[•]

O método DPPH[•] baseia-se na capacidade de compostos com características antioxidantes presentes nas amostras de se ligarem ao radical DPPH[•], porém só indica o poder redutor sem determinar quais os agentes pró-oxidantes. Durante a análise, os antioxidantes se ligam ao radical livre, e, dessa forma, a solução perde a coloração violeta e torna-se amarelada, de modo que a capacidade antioxidante é identificada pelo decréscimo no valor da absorbância (Brad-Williams *et al.*, 1995).

Inicialmente, foi elaborada uma solução estoque de DPPH[•] (24 mg diluído em 100 mL de álcool etílico absoluto), e, a partir dessa solução, foi gerada uma solução de trabalho na diluição 1:10 em álcool etílico absoluto. Preparou-se também uma solução padrão de Trolox a 2 mM (25 mg em 50 mL de álcool etílico absoluto) como referência. Em seguida, foram elaboradas diferentes diluições dos extratos e deles foi retirado alíquotas de 50 µL e adicionado 1950 µL da solução de trabalho de DPPH[•]. Para o controle negativo foi utilizado 50 µL da solução extratora e 1950 µL da solução de trabalho de DPPH[•], enquanto o branco foi formado apenas pela solução extratora. Essas misturas foram deixadas em repouso no escuro por 30 minutos a temperatura ambiente ($25 \pm 0,5$ °C), e, posteriormente, 250 µL da mistura foram transferidos para uma microplaca de 96 poços, sendo realizada a leitura em comprimento de onda de 515 nm utilizando espectrofotômetro BioTek Eon (Winooski, VT, USA), com finalidade de medir a diminuição na concentração do radical livre DPPH[•]. A capacidade antioxidante foi calculada usando uma curva padrão de Trolox a 2 mM (50-2000 µM) e os percentuais de inibição foram calculados por meio da Equação 2.

$$\% \text{ Inibição DPPH} = \frac{\text{ABSc} - (\text{ABSa} - \text{ABSb})}{\text{ABSc}} \times 100 \quad (2)$$

Onde: “ABSc” é a absorbância do controle, “ABSa” é a absorbância da amostra e “ABSb” corresponde a absorbância do branco. Os resultados foram expressos em μM trolox/g de amostra (μmol Trolox TEAC/g).

3.11.3 Capacidade antioxidante – Método FRAP

O método FRAP tem por finalidade determinar a redução do ferro, sendo aplicado em uma variedade de alimentos. À medida que um determinado composto apresenta atividade antioxidante, ocorre a redução do complexo TPTZ (2,4,6-tri(2-piridil)-1,3,5-triazina) com Fe^{3+} , passando de uma coloração azul-claro para azul-escuro. Para a análise, o reagente FRAP foi preparado utilizando uma mistura de 25 mL de tampão acetato (0,3M, pH 3,6), 2,5 mL de solução TPTZ e 2,5 mL de solução aquosa de cloreto férrico a 20 mM em 50 mL de água destilada (Rufino *et al.*, 2006)

Os extratos foram utilizados para preparar as diferentes diluições. Retirou-se 45 μL de cada solução e acrescentou-se 135 μL de água destilada, seguido da adição de 1,35 mL do reagente FRAP. Foi realizada a homogeneização em agitador de tubos tipo Vortex (Tecnal®) e a mistura foi incubada em banho ultratermostatizado (Splabor®) a temperatura de $37 \pm 0,5$ °C por 30 minutos, sob proteção da luz. Em seguida, 250 μL da mistura foi colocado em microplaca de 96 poços e realizada a leitura em espectrofotômetro BioTek Eon (Winooski, VT, USA) em comprimento de onda de 595 nm. A capacidade antioxidante foi calculada usando uma curva de sulfato ferroso a 2 nM (em 50 mL de água destilada) como referência (50-2000 μM). Os resultados foram expressos em μmol de equivalentes de sulfato ferroso por g de amostra (μmol FeSO_4/g).

3.11.4 Capacidade antioxidante – Método ABTS^{•+}

O método ABTS^{•+} é amplamente utilizado por ser prático e rápido, porém sensível, podendo medir a capacidade antioxidante de compostos de natureza hidrofílica e lipofílica. Nesse método, a capacidade antioxidante é observada com a redução da absorbância (Re *et al.*, 1999).

Inicialmente, o ABTS^{•+} foi dissolvido em água resultando numa solução de concentração de 7mM. Essa solução foi misturada com persulfato de potássio a 140 mM, e incubados a temperatura de 25 ± 1 °C no escuro durante 16 horas. Nesse período ocorreu a cationização do radical ABTS^{•+}, representado pela coloração azul cromóforo. Após a etapa de incubação, o radical foi diluído em álcool etílico absoluto até atingir o valor de absorbância de $0,70 \pm 0,05$ a 734 nm. Antes da realização da análise, foram preparadas diferentes diluições dos extratos de cada amostra. De cada diluição foi retirado uma alíquota de 50 µL e colocada em microplaca de 96 poços com adição de 250 µL do radical ABTS^{•+}. Essas amostras permaneceram por 6 minutos em repouso sob abrigo da luz, sendo realizada a leitura da absorbância em comprimento de onda de 734 nm usando espectrofotômetro BioTek Eon (Winooski, VT, USA), com a finalidade de medir a diminuição na concentração do radical livre ABTS^{•+}. Para o branco foi utilizado apenas a solução extratora (300 µL). A atividade antioxidante foi calculada usando uma curva padrão de Trolox a 2 mM (50-2000 µM) e os percentuais de inibição foram calculados por meio da Equação 3.

$$\% \text{ Inibição ABTS} = \frac{\text{ABSc} - (\text{ABSCa} - \text{ABSCb})}{\text{ABSCc}} \times 100 \quad (3)$$

Onde: “ABSc” é a absorbância do controle, “ABSa” é a absorbância da amostra e “ABScb” é a absorbância do branco. Os resultados foram expressos em µM trolox/g de amostra (µmol Trolox/g).

3.12 EXPOSIÇÃO DOS NUTRACÊUTICOS À DIGESTÃO GASTROINTESTINAL SIMULADA

Os nutracêuticos foram expostos à digestão gastrointestinal durante o armazenamento (tempo zero, 45 e 90 dias) em temperatura de refrigeração ($4 \pm 0,5$ °C) (11% UR). De acordo com o cálculo da densidade do LCJ, os nutracêuticos JM e JFM foram reidratados com 33 mL (1:5,5; p/v) de água destilada esterilizada sob temperatura ambiente, e homogeneizada por 15 minutos. Após esse período, a digestão simulada foi realizada em fases que imitam as condições da boca, estômago, duodeno e íleo, conforme metodologia descrito por Minekus *et al.*, 2014, com adaptações, incluindo o tempo de exposição e agitação em todas as fases. A agitação mecânica, para simular os movimentos peristálticos, foi realizada em incubadora de bancada

tipo *shaker* (TECNAL TE-424, São Paulo, Brasil) com controle de agitação e temperatura à $37 \pm 0,5$ °C.

A condição oral foi simulada com 100 U/mL α -amilase diluída em solução de cloreto de cálcio (CaCl_2) a 1 mM, com o pH ajustado para 6,9 com solução de bicarbonato de sódio (NaHCO_3) a 1 M, com tempo de exposição de 2 min a 200 rpm de agitação. A condição estomacal foi simulada com 25 mg de pepsina diluída em 1 mL de ácido clorídrico (HCl) a 0,1 M, pH ajustado para 2,0 com HCl a 1 M, durante 90 minutos sob agitação de 130 rpm. A condição duodenal foi simulada com 2 g de pancreatina e 12 g sais biliares bovinos por litro de solução de NaHCO_3 a 0,1 M, com pH ajustado para 5,0 com solução de NaHCO_3 a 0,1 M, tempo de exposição de 30 min, sob agitação de 45 rpm. Por fim, as condições do íleo foram simuladas com pH ajustado para 6,5 com solução de NaHCO_3 a 0,1 M, tempo de exposição de 60 minutos sob mesma agitação da etapa anterior. Todas as enzimas e os sais biliares foram adquiridos da Sigma-Aldrich (St. Louis, EUA).

3.12.1 Enumeração de células viáveis e avaliação do estado fisiológico celular

Em cada fase de simulação do TGI foram retiradas alíquotas para determinação da contagem de células viáveis e avaliação do estado fisiológico de acordo com procedimento descrito nas seções 3.4 e 3.9, respectivamente.

3.12.2 Determinação da bioacessibilidade dos compostos fenólicos

A bioacessibilidade dos compostos fenólicos presentes nos nutracêuticos foi avaliada considerando a quantidade total em cada fração após a digestão simulada comparada à quantidade inicial, sendo calculada utilizando a equação 4 (Güven *et al.*, 2018).

$$\% \text{ Bioacessibilidade} = \left(\frac{\text{Concentração após digestão}}{\text{Concentração antes da digestão}} \right) \times 100 \quad (4)$$

3.12.3 Determinação da capacidade antioxidante durante exposição as condições simuladas do TGI

A capacidade antioxidante foi determinada em todas as fases da digestão simulada de acordo com procedimento descrito na seção 3.11.

3.13 ANÁLISES ESTATÍSTICAS

Todas as análises foram realizadas em triplicata em três experimentos independentes e os resultados foram expressos como média e desvio padrão. A diferença entre os dados obtidos foi determinada por meio do teste t de Student ou Análise de Variância (ANOVA) seguido do teste de Tukey, considerando nível de significância de 5% ($p \leq 0,05$). A análise de componentes principais (PCA) e o teste de correlação de Pearson avaliaram a relação entre as variáveis dependentes. O software Sigma Stat 3.5 (Jandel Scientific Software, San Jose, CA, EUA) e software R (versão 2.15.3, Ross Ihaka & Robert Gentleman, University of Auckland, Auckland, Nova Zelândia) foram utilizados para realizar as análises estatísticas.

4 RESULTADOS

Os resultados da tese são apresentados na forma de dois artigos originais, disponíveis no apêndice A e B. O artigo apresentado no apêndice A é intitulado “*Thermal and storage stability of novel nutraceuticals combining potential probiotic *Limosilactobacillus fermentum* strains and freeze-dried jabuticaba [*Myrciaria cauliflora* (Mart.) O. Berg] peel*”, publicado no periódico Brazilian Journal of Microbiology (<https://doi.org/10.1007/s42770-024-01576-8>), o qual avaliou a estabilidade física e microbiológica de nutracêuticos (JM e JFM) compostos por liofilizado da casca de jabuticaba (LCJ) e cultura mista de *Limosilactobacillus fermentum* armazenados em temperatura ambiente e sob refrigeração. Os nutracêuticos foram caracterizados em relação a estabilidade térmica e durante o armazenamento controlado foram monitorados em relação a enumeração de células viáveis, estado fisiológico celular, capacidade antioxidante, composição de fenólicos, solubilidade, higroscopicidade e aspectos estruturais.

Os resultados mostraram que JM e JFM mantidos sob refrigeração apresentaram picos endotérmicos em temperaturas superiores (68,96 e 118,33 °C, respectivamente), enquanto na temperatura ambiente os picos endotérmicos ocorreram em temperaturas inferiores (56,03 °C e 110,83 °C, respectivamente). Foi verificado que JFM exibiu a maior temperatura de transição vítrea (118,33 °C), possivelmente devido a presença do FOS na formulação. O controle da atividade de água, solubilidade e higroscopicidade foram fundamentais para manutenção da estabilidade dos nutracêuticos. Os nutracêuticos mantiveram a atividade de água $<0,3$, indicando estabilidade, visto que as reações de degradação físico-químicas e atividades microbianas são favorecidas em atividade de água $>0,6$. A solubilidade é um fator importante na elaboração de nutracêuticos, de modo que JFM até o final do armazenamento apresentou solubilidade superior e maiores valores de higroscopicidade, possivelmente devido a presença do FOS; entretanto, tal característica não implicou negativamente na contagem de células viáveis e no estado fisiológico de *L. fermentum*. Durante todo o armazenamento, JFM mantido sob refrigeração apresentou contagem de células viáveis $>6,6$ log CFU/g e elevado percentual de células consideradas viáveis mais não cultiváveis (VBNC), o que se caracteriza como uma condição fisiológica reversível. A refrigeração foi importante para manutenção da estabilidade dos nutracêuticos, pois a contagem de células viáveis, estado fisiológico, a composição de compostos fenólicos e sua capacidade antioxidante foram mais expressivos sob essa condição. Diante das condições testadas, o JFM refrigerado apresentou maior potencial de funcionalidade ao longo do armazenamento, sendo necessário avançar em investigações *in vivo* para confirmar sua funcionalidade como novo suplemento alimentar.

O segundo artigo apresentado no apêndice B intitula-se “*Investigating the retention of nutraceutical properties of combined jabuticaba peel and Limosilactobacillus fermentum during gastrointestinal digestion for long-term storage*”. Este artigo apresenta os resultados da bioacessibilidade dos compostos fenólicos, atividade antioxidante, viabilidade celular e estado fisiológico de *Limosilactobacillus fermentum* (138, 296 e 263) nos nutracêuticos JM [casca de jabuticaba liofilizada (LCJ) + cultura mista de *L. fermentum*] e JFM [casca de jabuticaba liofilizada (LCJ) + cultura mista de *L. fermentum* + frutooligossacarídeos], quando sob armazenamento controlado (0, 45 e 90 dias, $4 \pm 0,5$ °C, 11% de umidade relativa), antes e durante as fases da digestão gastrointestinal simulada.

Os nutracêuticos desenvolvidos demonstraram uma excelente capacidade de sobrevivência, tanto durante o armazenamento quanto no processo de digestão gastrointestinal simulado. As contagens de células viáveis permaneceram >6 log UFC/mL em JFM ao longo de todo o armazenamento, e $>3,76$ log UFC/mL durante a digestão simulada. Embora JM tenha apresentado valores inferiores, conseguiu manter a viabilidade das células ao longo do processo. O maior percentual de células com atividade enzimática e membrana intacta foi observado em JFM, alcançando $29,1 \pm 0,66\%$, enquanto o menor percentual de células com dano na membrana foi de $5,8 \pm 0,48\%$. A exposição às condições do processo de digestão gastrointestinal simulado resultou na redução da viabilidade celular e no aumento dos danos na membrana das cepas de *L. fermentum* presentes nos nutracêuticos.

A bioacessibilidade dos compostos bioativos apresentou variações ao longo das diferentes fases da digestão. As antocianinas mostraram-se mais bioacessíveis após a exposição à fase gástrica, enquanto o ácido elágico teve sua maior bioacessibilidade nas condições intestinais. A atividade antioxidante foi mantida durante todo o processo de digestão gastrointestinal, embora tenha ocorrido uma redução esperada em cada fase, possivelmente devido à diminuição dos compostos fenólicos. Além disso, a presença desses compostos fenólicos ao final da digestão simulada pode promover alterações na microbiota intestinal, resultando em efeitos benéficos para a saúde. Portanto os resultados obtidos sugerem destaque para o nutracêutico JFM armazenado sob refrigeração como candidatos a serem administrados em animais e humanos para verificar os efeitos desempenhados a nível sistêmico.

O desenvolvimento dessa tese forneceu resultados relevantes sobre aspectos funcionais e tecnológicos da casca da jabuticaba junto a cepas com potencial probiótico isoladas de subproduto resultante do processamento de frutas. Foram encontradas concentrações relevantes de compostos fenólicos no liofilizado da casca da jabuticaba, que possivelmente são responsáveis por direcionar e proteger as cepas de *L. fermentum* durante a digestão

gastrointestinal simulada. Foi observado que os nutracêuticos elaborados conseguiram manter a estabilidade durante o armazenamento controlado de 90 dias, contudo os nutracêuticos armazenados sob temperatura de refrigeração expôs os melhores resultados de viabilidade celular, estado fisiológico das cepas e atividade antioxidante.

A presença de compostos fenólicos até o final da digestão simulada, aliada à manutenção da viabilidade celular e do estado fisiológico das cepas por até 90 dias de armazenamento, demonstra o potencial do liofilizado da casca de jabuticaba combinado com cepas de *L. fermentum* (296, 139 e 263) na formulação de nutracêuticos. Essa abordagem não apenas promove o aproveitamento de subprodutos do processamento de frutas como fontes sustentáveis de nutrientes, mas também se apresenta como uma estratégia promissora para impulsionar a economia circular. Pesquisas futuras podem explorar a aplicação desses nutracêuticos em estudos *in vivo*, visando uma compreensão mais aprofundada dos compostos presentes e de seus potenciais benefícios à saúde.

REFERÊNCIAS

- ADITYA, T. *et al.* Surface modification of bacterial cellulose for biomedical applications. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 23, 2022. <https://doi.org/10.3390%2Fijms23020610>
- AÏT -KADDOUR, A. *et al.* Transforming plant-based waste and by-products into valuable products using various “Food Industry 4.0” enabling technologies: A literature review. **Science of The Total Environment**, v. 955, 2024. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2024.176872>
- ALALI, M. *et al.* Nutraceuticals: transformation of conventional foods into health promoters/disease preventers and safety considerations. **Molecules**, v. 26, n. 2540, p. 1-28, 2021. <https://doi.org/10.3390/molecules26092540>
- ALBUQUERQUE, T. M. R. *et al.* In vitro characterization of *Lactobacillus* Strains isolated from fruit processing by-products as potential probiotics. **Probiotics and Antimicrobial Proteins**, v. 10, p. 704–716, 2018. <https://doi.org/10.1007/s12602-017-9318-2>
- ALBUQUERQUE, B. R. *et al.* Jaboticaba residues (*Myrciaria jaboticaba* (Vell.) Berg) are rich sources of valuable compounds with bioactive properties. **Food Chemistry**, v. 390, 2020. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2019.125735>
- ALBUQUERQUE, B. R. *et al.* Phenolic compounds: current industrial applications, limitations and future challenges. **Food & Function**, v. 12, p. 14-29, 2021. <https://doi.org/10.1039/d0fo02324h>
- ALI, A. *et al.* Engineered nano scale formulation strategies to augment efficiency of nutraceuticals. **Journal of Functional Foods**, v. 62, 2019. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2019.103554>
- ALMEIDA, R. L. J. *et al.* Determinação de compostos bioativos e composição físico-química da farinha da casca de jaboticaba obtida por secagem convectiva e liofilização. **Research, Society and Development**, v. 9, n. 1, 2020. <https://doi.org/10.33448/rsd-v9i1.1876>
- ALVES, J. L. B. *et al.* Phenolic compounds in hypertension: Targeting gut-brain interactions and endothelial dysfunction. **Journal of Functional Foods**, v. 104, 2023. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2023.105531>
- ANDRADE, F. H. D. *et al.* Solid-state characterization of the new antiparasitic drug 5-((5-bromo-1 H-indol-3-yl) methylene)-3-(2, 6-difluorobenzyl) thiazolidine-2, 4-dione (GQ-238). **Journal of Thermal Analysis and Calorimetry**, v. 141, n. 4, p. 1379-1387, 2020. <https://doi.org/10.1007/s10973-019-09122-7>
- AOAC. **Official methods of analysis of AOAC international**. 21th. ed. Gaithersburg, Md.: AOAC International, 2019. 3390 p.

- ARAÚJO, C. M. *et al.* Protective effects of tropical fruit processing coproducts on Probiotic *Lactobacillus* strains during freeze-drying and storage. **Microorganisms**, v. 8, n. 96, 2020. <https://doi.org/10.3390/microorganisms8010096>
- ARAÚJO, C. M. *et al.* Exploiting tropical fruit processing coproducts as circular resources to promote the growth and maintain the culturability and functionality of probiotic lactobacilli. **Food Microbiology**, v. 123, 2024a. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2024.104596>
- ARAÚJO, C. M. *et al.* Fermenting acerola (*Malpighia emarginata* D.C.) and guava (*Psidium guayaba* L.) fruit processing co-products with probiotic lactobacilli to produce novel potentially synbiotic circular ingredients. **Foods**, v.13, 2024b. <https://doi.org/10.3390/foods13091375>
- ATHAYDE, A. J. A. A. *et al.* Physiological and Technological Properties of Probiotic *Lactacaseibacillus rhamnosus* GG Encapsulated with Alginate-Chitosan Mixture and Its Incorporation in Whole Milk. **Probiotics and Antimicrobial Proteins**, 2024. <https://doi.org/10.1007/s12602-024-10345-w>
- AURA, A. M. *et al.* *In vitro* metabolism of anthocyanins by human gut microflora. **European Journal of Nutrition**, v. 44, n. 3, p. 133– 142, 2005. <https://doi.org/10.1007/s00394-004-0502-2>
- BAKÓ, I. *et al.* Outstanding Properties of the Hydration Shell around β -d-Glucose: A Computational Study. **Omega**, v. 9, p. 20331-20337, 2024. <https://doi.org/10.1021/acsomega.4c00798>
- BARRETO, N. M. B. *et al.* Organic black beans (*Phaseolus vulgaris* L.) from Rio de Janeiro State, Brazil, present more phenolic compounds and better nutritional profile than nonorganic. **Foods**, v. 10, 2021. <https://doi.org/10.3390/foods1004090>
- BARROS, R. G. C. *et al.* *In vitro* gastrointestinal digestion and probiotics fermentation impact on bioaccessibility of phenolics compounds and antioxidant capacity of some native and exotic fruit residues with potential antidiabetic effects. **Food Research International**, v. 136, 2020. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2020.109614>
- BARROSO, T. *et al.* Semi-continuous flow-through hydrothermal pretreatment for the recovery of bioproducts from jabuticaba (*Myrciaria cauliflora*) agro-industrial by-product. **Food Research International**, v. 158, 2022. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2022.111547>
- BARROSO, T. L. C. T. *et al.* Simple procedure for the simultaneous extraction and purification of anthocyanins using a jabuticaba byproduct biosorbent. **Jornal of Food Composition and Analysis**, v. 130, 2024.
- BARROSO, T. L. C. T. *et al.* Optimization of a microwave-assisted extraction method for the recovery of the anthocyanins from jabuticaba by-products. **Agronomy**, v. 13, 2023. <https://doi.org/10.3390/agronomy13020556>

BASEGGIO, A. M. *et al.* Jaboticaba peel extract decrease autophagy in white adipose tissue and prevents metabolic disorders in mice fed with a high-fat diet. **PharmaNutrition**, v. 6, p. 147–156, 2018. <https://doi.org/10.1016/j.phanu.2018.06.006>

BASHOLLI-SALIHU, M. *et al.* Prebiotics as excipients for enhancement of stability and functionality of *Bifidobacterium longum* ssp. *infantis* with potential application as symbiotics in food and pharmaceuticals. **Pharmazie**, v. 74, p. 326-333, 2019. <https://doi.org/10.1691/ph.2019.9007>

BBC. **Nutraceuticals: Global markets to 2023**. Disponível em: <https://www.bccresearch.com/market-research/food-and-beverage/nutraceuticals-global-markets.html>. Acesso em: 10 nov 2023.

BESLO, D. *et al.* Antioxidant Activity, metabolism, and bioavailability of polyphenols in the diet of animals. **Antioxidants**, v. 12, 2023. <https://doi.org/10.3390%2Fantiox12061141>

BHUSHAN, B. *et al.* Beyond colors: The health benefits of maize anthocyanins. **Applied Food Research**, v. 4, 2024. <https://doi.org/10.1016/j.afres.2024.100399>

BIÉ, J. *et al.* Polyphenols in Health and Disease: Gut Microbiota, Bioaccessibility, and Bioavailability. **Compounds**, v. 3, p. 40-72, 2023. <https://doi.org/10.3390/compounds3010005>

BOLAT, E. *et al.* Polyphenols: Secondary Metabolites with a Biological Impression. **Nutrients**, v. 16, 2024. <https://doi.org/10.3390/nu16152550>

BOMMAKANTI, V. *et al.* An overview of herbal nutraceuticals, their extraction, formulation, therapeutic effects and potential toxicity. **Separations**, v. 10, 2023. <https://doi.org/10.3390/separations10030177>

BORA, A. F. M. *et al.* Improved viability of microencapsulated probiotics in a freeze-dried banana powder during storage and under simulated gastrointestinal tract. **Probiotics and Antimicrobial Proteins**, v. 11, 2019. <https://doi.org/10.1007/s12602-018-9464-1>

BRAND-WILLIAMS, W. *et al.* Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. **LWT- Food Science and Technology**, v. 28, p. 25-30, 1995.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. RDC nº 243, de 26 de julho de 2018. Dispõe sobre os requisitos para composição, qualidade, segurança e rotulagem dos suplementos alimentares e para atualização das listas de nutrientes, substâncias bioativas, enzimas e probióticos, de limites de uso, de alegações e de rotulagem complementar destes produtos. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**, Brasília, DF, 26 jul. 2018a.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. IN nº 28, de 26 de julho de 2018. Dispõe sobre as listas de constituintes, de limites de uso, de alegações e de rotulagem complementar dos suplementos alimentares. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**, Brasília, DF, 27 jul. 2018b.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. RDC nº 241, de 26 de julho de 2018. Dispõe sobre os requisitos para comprovação da segurança e dos benefícios à saúde dos probióticos para uso em alimentos. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**, Brasília, DF, 26 jul. 2018c.

CÁDIZ-GURREA, M. L. *et al.* Revalorization of bioactive compounds from tropical fruit by-products and industrial applications by means of sustainable approaches. **Food Research International**, v. 138, 2020. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2020.109786>

CAI, Y. Z.; CORKE, H. Production and properties of spray dried amaranthus betacyanin pigments. **Journal of Food Science**, v. 65, 2000. <https://doi.org/10.1111/j.1365-621.2000.tb10273.x>

CALLONI, C. *et al.* Jabuticaba [*Plinia trunciflora* (O. Berg) Kausel] Protects Liver of Diabetic Rats Against Mitochondrial Dysfunction and Oxidative Stress Through the Modulation of SIRT3 Expression. **Frontiers in Physiology**, v. 12, 2021. <https://doi.org/10.3389/fphys.2021.665747>

CÂMARA, J. S. *et al.* Behind the scenes of anthocyanins—from the health benefits to potential applications in food, pharmaceutical and cosmetic fields. **Nutrients**, v. 14, 2022. <https://doi.org/10.3390/n14235133>

CAMELO-SILVA, C. *et al.* Innovation and trends in probiotic microencapsulation by emulsification techniques. **Food Engineering Reviews**, v. 14, 2022. <https://doi.org/10.1007/s12393-022-09315-1>

CANO-CHAUCA, M. *et al.* Effect of the carriers on the microstructure of mango powder obtained by spray drying and its functional characterization. **Innovative Food Science and Emerging Technologies**, v. 6, 2005. <https://doi.org/10.1016/j.ifset.2005.05.003>

CARVALHO, F. *et al.* Phenolic Compounds from Cherries and Berries for Chronic Disease Management and Cardiovascular Risk Reduction. **Nutrients**, v. 16, 2024. <https://doi.org/10.3390/n16111597>

CASTANGIA, I. *et al.* Jabuticaba (*Myrciaria jaboticaba*) Peel as a Sustainable Source of Anthocyanins and Ellagitannins Delivered by Phospholipid Vesicles for Alleviating Oxidative Stress in Human Keratinocytes. **Molecules**, v. 26, n. 6697, 2021. <https://doi.org/10.3390/molecules26216697>

CAVALCANTE, R. G. S. *et al.* The probiotic *Lactobacillus fermentum* 296 attenuates cardiometabolic disorders in high fat diet-treated rats. **Nutrition, Metabolism and Cardiovascular Diseases**, v. 29, 2019. <https://doi.org/10.1016/j.numecd.2019.08.003>

CENTURION, F. *et al.* Cell-mediated biointerfacial phenolic assembly for probiotic nano encapsulation. **Advanced Functional Materials**, v. 32, 2022. <https://doi.org/10.1002/adfm.202200775>

CHELLUBOINA, B.; VEMUGANTI, R. Therapeutic potential of nutraceuticals to protect brain after stroke. **Neurochemistry International**, v. 142, 2021. <https://doi.org/10.1016/j.neuint.2020.104908>

CHEN, T. et al. Anthocyanins-natural pigment of colored rice bran: Composition and biological activities. **Food Research International**, v. 175, 2024. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2023.113722>

COELHO, V. S. *et al.* Incorporation of microencapsulated polyphenols from jabuticaba peel (*Plinia* spp.) into a dairy drink: stability, *in vitro* bioaccessibility, and glycemic response. **Food Research International**, v. 189, 2024. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2024.114567>

CRUZ NETO, J. P. R. *et al.* Targeting Gut Microbiota with Probiotics and Phenolic Compounds in the Treatment of Atherosclerosis: A Comprehensive Review. **Foods**, v. 11, 2886, 2024. <https://doi.org/10.3390/foods13182886>

CRUZ NETO, J. P. R. *et al.* Safety Evaluation of a Novel Potentially Probiotic *Limosilactobacillus fermentum* in Rats. **Probiotics and Antimicrobial Proteins**, 2023. <https://doi.org/10.1007/s12602-023-10077-3>

CUVAS-LIMON, R. B. *et al.* Effect of Gastrointestinal Digestion on the Bioaccessibility of Phenolic Compounds and Antioxidant Activity of Fermented *Aloe vera* Juices. **Antioxidants**, v. 11, 2022. <https://doi.org/10.3390/antiox11122479>

DABRAVOSLKI, S. A.; ISAYENKOV, S. V. The Role of Anthocyanins in Plant Tolerance to Drought and Salt Stresses. **Plants**, v. 12, 2023. <https://doi.org/10.3390/plants12132558>

DAI, M. *et al.* A Nanostructured moisture-absorbing gel for fast and large-scale passive dehumidification. **Advanced Materials**, v. 34, 2022. <https://doi.org/10.1002/adma.202200865>

DAL CASTEL, A. P. *et al.* Water sorption isotherms on lyophilized jabuticaba (*Myrciaria cauliflora*) peel: potential byproduct for the production of dehydrated foods. **Journal of Food Science and Technology**, v. 60, n. 1, 2023. <https://doi.org/10.1007/s13197-022-05628-5>

DANGI, P. *et al.* Nanotechnology impacting probiotics and prebiotics: a paradigm shift in nutraceuticals technology. **International Journal of Food Microbiology**, v. 388, 2023. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2022.110083>

DANNER, M. A. *et al.* Formação de mudas de jabuticabeira (*Plinia* sp.) em diferentes substratos e tamanhos de recipientes. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 29, n. 1, p. 179–182, 2007. <https://doi.org/10.1590/S0100-29452007000100038>

DANTAS, A. *et al.* Current knowledge about physical properties of innovative probiotic spray-dried powders produced with lactose-free milk and prebiotics. **LWT – Food Science and Technology**, v. 151, p. 112175, 2021. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2021.112175>

DELGADO, A. *et al.* Mediterranean Diet: The Role of Phenolic Compounds from Aromatic Plant Foods. **Foods**, v. 12, 2023. <https://doi.org/10.3390/foods12040840>

- DEMIRCAN, B.; VELIOGLU, Y. S.; GIUFFRÉ, A. M. Bergamot juice powder with high bioactive properties: Spray-drying for the preservation of antioxidant activity and ultrasound-assisted extraction for enhanced phenolic compound extraction. **Journal of Food Science**, v. 88, 2023. <https://doi-org.ez15.periodicos.capes.gov.br/10.1111/1750-3841.16706>
- DESAI, T. *et al.* Effects of short-term continuous Montmorency tart cherry juice supplementation in participants with metabolic syndrome. **European Journal of Nutrition**, v. 60, p. 1587–1603, 2021. <https://doi.org/10.1007/s00394-020-02355-5>
- DI, L. *et al.* Synergistic combination of cryoprotectants for high freeze-dried survival rate and viable cell counts of *Streptococcus thermophilus*. **Drying Technology**, v. 41, 2023. <https://doi.org/10.1080/07373937.2022.2155971>
- DONNO, D. *et al.* Freeze-Drying for the Reduction of Fruit and Vegetable Chain Losses: A Sustainable Solution to Produce Potential Health-Promoting Food Applications. **Plants**, v. 14, 168, 2025. <https://doi.org/10.3390/plants14020168>
- DUQUE-SOTO, C. *et al.* Extraction, Characterization, and Bioactivity of Phenolic Compounds-A Case on Hibiscus Genera. **Foods**, v. 12, 2023. <https://doi.org/10.3390/foods12050963>
- DURAZZO, A. *et al.* An updated overview on nanonutraceuticals: focus on nanoprebiotics and nanoprobiotics. *International Journal of Molecular Sciences*, v. 21, n. 2285, p. 1-24, 2020. <https://doi.org/10.3390/ijms21072285>
- ELGAMAL, R. *et al.* Thermal degradation of bioactive compounds during drying process of horticultural and agronomic products: A comprehensive overview. **Agronomy**, v. 13, 2023. <https://doi.org/10.3390/agronomy13061580>
- FALLER, A. L. K. *et al.* Jaboticaba (*Myrciaria jaboticaba*) peel and seed powder associated with bioprocessing improves functional and nutritional quality of whole-wheat bread. **International Journal of Food Science and Technology**, v. 58, p. 1411–1422, 2023. <https://doi.org/10.1111/ijfs.16303>
- FENG, T.; WANG, J. Oxidative stress tolerance and antioxidant capacity of lactic acid bacteria as probiotic: a systematic review. **Gut Microbes**, v. 12, n. 1, p. 1-24, 2020. <https://doi.org/10.1080/19490976.2020.1801944>
- FERREIRA, G. A. H. *et al.* Potentially probiotic *Limosilactobacillus fermentum* fruit-derived strains alleviate cardiometabolic disorders and gut microbiota impairment in male rats fed a high-fat diet. **Probiotics and Antimicrobial Proteins**, v. 14, 2022. <https://doi.org/10.1007/s12602-021-09889-y>
- FERNANDES, F. A. N. *et al.* Ultrasound-assisted extraction of anthocyanins and phenolics from jaboticaba (*Myrciaria cauliflora*) peel: kinetics and mathematical modeling. **Journal of Food Science and Technology**, v. 57, n. 6, p. 2321–2328, 2020. <https://doi.org/10.1007/s13197-020-04270-3>

FERNANDEZ-PAN, I. *et al.* Stabilization and valorization of tomato byproduct: A case study for the bakery industry. **Journal of Food Science**, v. 88, 2023. <https://doi.org/10.1111/1750-3841.16777>

FIDELIS, M. *et al.* Polyphenols of jaboticaba [*Myrciaria jaboticaba* (Vell.) O.Berg] seeds incorporated in a yogurt model exert antioxidant activity and modulate gut microbiota of 1,2-dimethylhydrazine-induced colon cancer in rats. **Food Chemistry**, v. 334, 2021. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2020.127565>

FREIRE, L. M. O. *et al.* Effects of a mixed *Limosilactobacillus fermentum* formulation with claimed probiotic properties on cardiometabolic variables, biomarkers of inflammation and oxidative stress in male rats fed a high-fat Diet. **Foods**, v. 10, 2021. <https://doi.org/10.3390/foods10092202>.

FREIRE, M. O. L. *et al.* *Limosilactobacillus fermentum* strains as novel probiotic candidates to promote host health benefits and development of biotherapeutics: A comprehensive review. **Probiotics and Antimicrobial Proteins**, 2024. <https://doi.org/10.1007/s12602-024-10235-1>.

GARMASHEVA, I. *et al.* Exopolysaccharides of lactic acid bacteria as protective agents against bacterial and viral plant pathogens. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 276, 2024. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2024.133851>

GARCIA, E. 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, 2016. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.01371>

GARCÍA-CHACÓN, J. M. *et al.* Characterization and bioaccessibility assessment of bioactive compounds from camu-camu (*Myrciaria dubia*) powders and their food applications. *Food Research International*, v. 176, 2024. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2023.113820>

GE, S. *et al.* Research progress on improving the freeze-drying resistance of probiotics: A review. **Trends in Food Science & Technology**, 147, 2024. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2024.104425>

GENÇDAG, E. *et al.* Copigmentation and stabilization of anthocyanins using organic molecules and encapsulation techniques. **Current Plant Biology**, v. 26, 2022. <https://doi.org/10.1016/j.cpb.2022.100238>

GOMES, A. C. A. *et al.* Coatings with chitosan and phenolic-rich extract from acerola (*Malpighia emarginata* D.C.) or jaboticaba (*Plinia jaboticaba* (Vell.) Berg) processing byproduct to control rot caused by *Lasiodiplodia* spp. in papaya (*Carica papaya* L.) fruit. **International Journal of Food Microbiology**, v. 331, 2020. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2020.108694>

GUEDES, J. S. Protective effects of β -glucan extracted from spent brewer yeast during freeze-drying, storage and exposure to simulated gastrointestinal conditions of probiotic lactobacilli. **LWT – Food Science and Technology**, v. 116, 2019. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2019.108496>.

GUERGOLETTTO, K. B. *et al.* In vitro fermentation of juçara pulp (*Euterpe edulis*) by human colonic microbiota. **Food Chemistry**, v. 196, p. 251-258, 2016. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2015.09.048>

GU, Y. *et al.* Aqueous lithium chloride solution as a non-toxic bactericidal and fungicidal disinfectant for air-conditioning systems: Efficacy and mechanism. **Environmental Research**, v. 212, 2022. <https://doi.org/10.1016/j.envres.2022.113112>

GUMUS, S.; DEMIRCI, A. S. Survivability of probiotic strains, *Lactobacillus fermentum* CECT 5716 and *Lactobacillus acidophilus* DSM 20079 in grape juice and physico-chemical properties of the juice during refrigerated storage. **Food Science and Technology**, v. v. 42, 2022. <https://doi.org/10.1590/fst.08122>

GUVEN, O. *et al.* Food processing and digestion: the effect of extrusion process on bioactive compounds in extrudates with artichoke leaf powder and resulting *in vitro* cynarin and cynaroside bioaccessibility. **LWT - Food Science and Technology**, v. 90, 2018. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2017.12.042>

HADIDI, M. *et al.* Plant-based proteins from agro-industrial waste and by-products: Towards a more circular economy. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 261, 2024. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2024.129576>

HAN, S. *et al.* Hygroscopicity of organic compounds as a function of organic functionality, water solubility, molecular weight, and oxidation level. **Atmospheric Chemistry and Physics**, v. 22, 2022. <https://doi.org/10.5194/acp-22-3985-2022>.

HASSANPOUR, S. H., DOROUDI, A. Review of the antioxidant potential of flavonoids as a subgroup of polyphenols and partial substitute for synthetic antioxidants. **Avicenna Journal of Phytomedicine**, v. 13, 2023. <https://doi.org/10.22038/2FAJP.2023.21774>

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

IBRAHIM, H. M. S. *et al.* Symmetrical choline-derived dications display strong anti-kinetoplastid activity. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 66, p. 111-125, 2011. <https://doi.org/10.1093/jac/dkq401>

INADA, K. O. P. *et al.* Screening of the chemical composition and occurring antioxidants in jaboticaba (*Myrciaria jaboticaba*) and jussara (*Euterpe edulis*) fruits and their fractions. **Journal of Functional Foods**, v. 17, 2015. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2015.06.002>.

INADA, K. O. P. *et al.* Metabolism of ellagitannins from jaboticaba (*Myrciaria jaboticaba*) in normoweight, overweight and obese Brazilians: Unexpected laxative effects influence urolithins urinary excretion and metabotype distribution. **Journal of Functional Foods**, v. 57, p. 299-308, 2019. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2019.04.025>

INADA, K. O. P. *et al.* Effect of high hydrostatic pressure and drying methods on phenolic compounds profile of jaboticaba (*Myrciaria jaboticaba*) peel and seed. **Food Chemistry**,

v.309, 2020. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2019.125794>

INADA, K. O. P. *et al.* Jaboticaba berry: A comprehensive review on its polyphenol composition, health effects, metabolism, and the development of food products. **Food Research International**, v. 147, 2021. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2021.110518>

JAFARI, S. *et al.* Phenolic compound profile of probiotic (*Lacticaseibacillus rhamnosus* LR5) fortified vegetable tablet and probiotic survival in the simulated gastrointestinal tract. **Nature**, v. 12, 2022. <https://doi.org/10.1038/s41598-022-04874-z>

JOVANOVIC, M. S. *et al.* Natural deep eutectic solvents combined with cyclodextrins: A novel strategy for chokeberry anthocyanins extraction. **Food Chemistry**, v. 405, 2023. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2022.134816>

LANG, Y. *et al.* Classification and antioxidant assays of polyphenols: a review. **Journal of Future Foods**, v. 4, p. 193-204, 2024. <https://doi.org/10.1016/j.jfutfo.2023.07.002>

LATIF, A. *et al.* Probiotics: mechanism of action, health benefits and their application in food industries. **Frontiers in Microbiology**, 2023. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2023.1216674>

LAU, L. Y. J.; QUEK, S. J. Probiotics: Health benefits, food application, and colonization in the human gastrointestinal tract. **Food Bioengineering**, v. 3, p. 41-64, 2024. <https://doi.org/10.1002/fbe2.12078>

LEMOES, M. C. *et al.* Maceration of soybean oil with jaboticaba peel and rosemary leaves: An affordable and effective approach to enhance frying oil's stability. **International Journal of Gastronomy and Food Science**, v. 35, 2024. <https://doi.org/10.1016/j.ijgfs.2023.100867>

LI, C. X. *et al.* Stability and antioxidant activity of phenolic compounds during *in vitro* digestion. **Journal of Food Science**, v. 88, 2023. <https://doi.org/10.1111/1750-3841.16440>

LI, Z.; AHAMMED, G. J. Plant stress response and adaptation via anthocyanins: A review. **Plant Stress**, v. 10, 2023. <https://doi.org/10.1016/j.stress.2023.100230>

LIU, W. *et al.* Phenolic metabolites as therapeutic in inflammation and neoplasms: Molecular pathways explaining their efficacy. **Pharmacological Research**, v. 193, 2023. <https://doi.org/10.1016/j.phrs.2023.106812>

LIU, M. *et al.* Identification and functional characterization of *AcMYB113* in anthocyanin metabolism of *Aesculus chinensis* Bunge var. *chinensis* leaves. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 199, 2023. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2023.107709>

LIMA, R. *et al.* Chemical profile and hematoprotective activity of artisanal jaboticaba (*Plinia jaboticaba*) wine and derived extracts. **Fermentation**, v. 9, n. 157, 2023. <https://doi.org/10.3390/fermentation9020157>

LOUBET FILHO, P. S. *et al.* Gut microbiota modulation by jaboticaba peel and its effect on glucose metabolism via inflammatory signaling. **Current Research in Food Science**, v. 5, p. 382-391, 2022. <https://doi.org/10.1016/j.crfs.2022.02.001>

LOPES, J. C. *et al.* Grape Pomace: A Review of Its Bioactive Phenolic Compounds, Health Benefits, and Applications. **Molecules**, v. 30, 2024.
<https://doi.org/10.3390/molecules30020362>

MACEDO, E. H. B. C. *et al.* Unveiling the physicochemical properties and chemical profile of artisanal jabuticaba wines by bromatological and NMR-based metabolomics approaches. **LWT- Food Science and Technology**, v. 146, 2021.
<https://doi.org/10.1016/j.lwt.2021.111371>

MACHADO, K. R. D. *et al.* Production and Evaluation of Yogurt Colored with Anthocyanin-Rich Pigment Prepared from Jabuticaba (*Myrciaria cauliflora* Mart.) Skin. **Processes**, v. 11, 526, 2023. <https://doi.org/10.3390/pr11020526>

MAFALDO, I. M. *et al.* Survival during long-term storage, membrane integrity, and ultrastructural aspects of *Lactobacillus acidophilus* 05 and *Lacticaseibacillus casei* 01 freeze-dried with freshwater microalgae biomasses. **Food Research International**, v. 159, 2022.
<https://doi.org/10.1016/j.foodres.2022.111620>

MAFTEI, N. M. *et al.* The Potential Impact of Probiotics on Human Health: An Update on Their Health-Promoting Properties. **Microorganisms**, v. 12, 2024.
<https://doi.org/10.3390/microorganisms12020234>

MAKAREWICZ, M. *et al.* The Interactions between Polyphenols and Microorganisms, Especially Gut Microbiota. **Antioxidants**, v. 10, 2021.
<https://doi.org/10.3390/antiox10020188>

MAKKAR, R. *et al.* Nutraceuticals in neurological disorders. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 21, n. 4424, 2020. <https://doi.org/10.3390/ijms21124424>

MANASSI, C. F. *et al.* Functional meat products: Trends in pro-, pre-, syn-, para- and post-biotic use. **Food Research International**, v. 154, 2022. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2022.111035>

MARTINS, A. B. N. *et al.* Chemical, microbiological and sensory stability of steam extracted jaboticaba (*Myrciaria jaboticaba*) juice. **Foods**, v. 10, 2021.
<https://doi.org/10.3390/foods10040732>

MARTINS, T. A. *et al.* Use of murici (*Byrsonima crassifolia*) and jabuticaba (*Plinia cauliflora*) residues in the preparation of porous materials: Effect of pH on the adsorption efficiency of the contaminants phenol, diethylphthalate and amoxicillin. **Desalination and Water Treatment**, v. 317, 2024.

MASSA, N. M. L. *et al.* Effects of digested jabuticaba (*Myrciaria jaboticaba* (Vell.) Berg) by-product on growth and metabolism of *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* indicate prebiotic properties. **LWT - Food Science and Technology**, v. 131, 2020.
<https://doi.org/10.1016/j.lwt.2020.109766>

MATSUMURA, Y. *et al.* Dietary Phenolic Compounds: Their Health Benefits and Association with the Gut Microbiota. **Antioxidants**, v. 12, 880, 2023.
<https://doi.org/10.3390/antiox12040880>

MATTOS, G. N. *et al.* Anthocyanin extraction from jaboticaba skin (*Myrciaria cauliflora* Berg.) using conventional and non-conventional methods. **Foods**, v. 11, 2022. <https://doi.org/10.3390/foods11060885>

MAZZIOTTA, C. *et al.* Probiotics mechanism of action on immune cells and beneficial effects on human health. **Cells**, v. 184, 2023. <https://doi.org/10.3390/cells12010184>

MEDEIROS, G. K. V. V. *et al.* *Cereus jamacaru* DC. (mandacaru) fruit as a source of lactic acid bacteria with *in vitro* probiotic-related characteristics and its protective effects on *Pediococcus pentosaceus* during lyophilization and refrigeration storage. **International Journal of Food Microbiology**, v. 417, 2024. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2024.110695>

MENDONÇA, A. A. *et al.* Journey of the Probiotic Bacteria: Survival of the Fittest. **Microorganisms**, v. 11, 95, 2023. <https://doi.org/10.3390/microorganisms11010095>

MINEKUS, M. *et al.* A standardised static in vitro digestion method suitable for food - an international consensus. **Food Function**, v. 5, p. 1113-1124, 2014. <https://doi.org/10.1039/c3fo60702j>

MIRANDA, B. M. Potential of New Plant Sources as Raw Materials for Obtaining Natural Pigments/Dyes. **Agronomy**, v. 15, 2025. <https://doi.org/10.3390/agronomy15020405>

MOURA, M. H. C. *et al.* Long-term supplementation with phenolic compounds from jaboticaba (*Plinia jaboticaba* (Vell.) Berg) reduces adiposopathy and improves glucose, lipid, and energy metabolism. **Food Research International**, v. 143, 2021. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2021.11030>

NABI, B. G. *et al.* Natural pigments: Anthocyanins, carotenoids, chlorophylls, and betalains as colorants in food products. **Food Bioscience**, v. 52, 2024. <https://doi.org/10.1016/j.fbio.2023.102403>

NATIONAL CENTER FOR BIOTECHNOLOGY INFORMATION, 2021. PubChem compound summary for CID 433294, lithium chloride. Acesso em 2 de novembro, 2021 Publicado em: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Lithium-chloride>.

NASCIMENTO, R. P. *et al.* *Myrciaria jaboticaba* Fruit Peel: Bioactive Composition as Determined by Distinct Harvest Seasons and In Vitro Anti-Cancer Activity. **Plants**, v. 13, 2907, 2024. <https://doi.org/10.3390/plants13202907>

NASCIMENTO, H. M. A. *et al.* Thermal and storage stability of novel nutraceuticals combining potential probiotic *Limosilactobacillus fermentum* strains and freeze-dried jaboticaba [*Myrciaria cauliflora* (Mart.) O. Berg] peel. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 56, p. 23-38, 2025. <https://doi.org/10.1007/s42770-024-01576-8>

NASCIMENTO, D. S. *et al.* Evaluating the Stability of a Novel Nutraceutical Formulation Combining Probiotic *Limosilactobacillus fermentum* 296, Quercetin, and Resveratrol Under

Different Storage Conditions. **Probiotics and Antimicrobial Proteins**, 2022.
<https://doi.org/10.1007/s12602-022-10011-z>

NETRUSOV, A. I. *et al.* Exopolysaccharides Producing Bacteria: A Review. **Microorganisms**, v. 11, 2023. <https://doi.org/10.3390/microorganisms11061541>

NEVES, N. A. *et al.* Identification and quantification of phenolic composition from different species of Jabuticaba (*Plinia* spp.) by HPLC-DAD-ESI/MS. **Food Chemistry**, v. 355, 2021. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2021.129605>

NEVES, N. A. *et al.* Chemical composition of jabuticaba (*Plinia jaboticaba*) liquors produced from cachaça and cereal alcohol. **LWT – Food Science and Technology**, v. 155, 2022. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2021.112923>

NG, L. H. *et al.* Formulation strategies to improve the stability and handling of oral solid dosage forms of highly hygroscopic pharmaceuticals and nutraceuticals. **Pharmaceutics**, v. 14, n. 2015., 2022. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics14102015>

NOUFEU, T. *et al.* Overview of Glycometabolism of Lactic Acid Bacteria During Freeze-Drying: Changes, Influencing Factors, and Application Strategies. **Foods**, v. 14, 743, 2025.

NUNES, L. P. *et al.* Stability of jabuticaba flakes obtained by drum drying with cassava starch as additive. **Brazilian Journal of Food Technology**, v. 24, 2021. <https://doi.org/10.1590/1981-6723.08520>

NYAKANG'I, C. O. *et al.* Physicochemical Properties of Avocado Seed Extract Model Beverages and Baked Products Incorporated with Avocado Seed Powder. **International Journal of Food Science**, 2023. <https://doi.org/10.1155/2023/6860806>

OLIVEIRA, J. B. *et al.* Volatilome Study of Jabuticaba (*Plinia cauliflora*) Using a Hydrophilic Microporous Cartridge with Direct Immersion Solid Phase Microextraction and Gas Chromatography System With a Hybrid Quadrupole Time-Of-Flight Mass Spectrometry. **Journal of Separation Science**, 2024.

OLIVEIRA, G. P. *et al.* Origin and development of reproductive buds in jabuticaba cv. Sabará (*Plinia jaboticaba* Vell). **Scientia Horticulturae**, v. 249, p. 432-438, 2019. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2019.02.020>

PAL, P. *et al.* Circular Bioeconomy in Action: Transforming Food Wastes into Renewable Food Resources. **Foods**, v. 13, 3007, 2024. <https://doi.org/10.3390/foods13183007>

PAPARELLA, A. *et al.* Flow cytometric assessment of the antimicrobial activity of essential oils against *Listeria monocytogenes*. **Food Control**, v. 19, 2008. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2008.01.002>

PASQUET, P. L. *et al.* Stability and preservation of phenolic compounds and related antioxidant capacity from agro-food matrix: Effect of pH and atmosphere. **Food Bioscience**, v. 57, 2024. <https://doi-org.ez15.periodicos.capes.gov.br/10.1016/j.fbio.2024.103586>

PAUDEL, K. R. *et al.* Nutraceuticals and COVID-19: A mechanistic approach toward attenuating the disease complications. **Journal of Food Biochemistry**, v. 46, n. 12, p. 1-21, 2022. <https://doi.org/10.1111/jfbc.14445>

PAULA, D. G. C. D. *et al.* Maceration time over antioxidant activity, volatile compounds and temporal dominant sensation of fermented jabuticaba. **Food Science and Technology**, v. 42, 2022. <https://doi.org/10.1590/fst.43221>.

PAYNE, J. *et al.* The Potential of Bacillus Species as Probiotics in the Food Industry: A Review. **Foods**, v. 13, 2444, 2024. <https://doi.org/10.3390/foods13152444>

PEDROSA, G. T. S. *et al.* Physiological alterations involved in inactivation of autochthonous spoilage bacteria in orange juice caused by *Citrus* essential oils and mild heat. **International Journal of Food Microbiology**, v. 334, 2020. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2020.108837>

PELLEGRINO, M. *et al.* Application of Natural Edible Coating to Enhance the Shelf Life of Red Fruits and Their Bioactive Content. **Applied Sciences**, v. 14, 4552, 2024. <https://doi.org/10.3390/app14114552>

PEREIRA-CARO, G. *et al.* Chronic administration of a microencapsulated probiotic enhances the bioavailability of orange juice flavanones in humans. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 84, p. 206–214, 2015. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2015.03.010>

PÉREZ, C. R. **An analytical approach: from natural sources of bioactive compounds to nutraceuticals and functional foods. Development of extraction, characterization and bioactivity evaluation strategies.** 2016. 395 f. Tese (Doutorado em Química). Universidade de Granada, Espanha.

PRAKASH, A. *et al.* Effects of size on water vapour absorption and regeneration in lithium chloride nanocrystals. **Materials Today Communications**, v. 36, 2023. <https://doi.org/10.1016/j.mtcomm.2023.106388>

PINTO, K. R. D. *et al.* Production and evaluation of yogurt colored with anthocyanin-rich pigment prepared from jabuticaba (*Myrciaria cauliflora* Mart.) skin. **Processes**, v. 11, n. 2, 2023. <https://doi.org/10.3390/pr11020526>

POURJAFAR, H. *et al.* Functional and health-promoting properties of probiotics' exopolysaccharides; isolation, characterization, and applications in the food industry. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 63, 2023. <https://doi.org/10.1080/10408398.2022.2047883>

QIN, W. *et al.* Impact of the solubility of phenolic compounds from Highland Barley (*Hordeum vulgare* L.) on their antioxidant property and protein binding affinity. **LWT – Food Science and Technology**, v. 186, 2023. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2023.115251>

RAHEEM, A. *et al.* Modulatory effects of probiotics during pathogenic infections with emphasis on immune regulation. **Frontiers in Immunology**, v. 12, 2021. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2021.616713>

RAHMAN, M. *et al.* Role of phenolic compounds in human disease: Current knowledge and future prospects. **Molecules**, v. 27, 2022. <https://doi.org/10.3390%2Fmolecules27010233>

RAMACHANDRAN, R. P. *et al.* Advancement and Innovations in Drying of Biopharmaceuticals, Nutraceuticals, and Functional Foods. **Food Engineering Reviews**, v. 16, p. 540-566, 2024.

RASHIDINEJAD, A. *et al.* Co-encapsulation of probiotics with prebiotics and their application in functional/synbiotic dairy products. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 62, 2022. <https://doi.org/10.1080/10408398.2020.1854169>

RE, R. *et al.* Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. **Free Radical Biology and Medicine**, 26, 1999. [https://doi.org/10.1016/s0891-5849\(98\)00315-3](https://doi.org/10.1016/s0891-5849(98)00315-3)

REQUE, P. M.; Brandelli, A. Encapsulation of probiotics and nutraceuticals: Applications in functional food industry. **Trends in Food Science & Technology**, v. 114, p. 1-10, 2021. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2021.05.022>

RESENDE, L. M. *et al.* Polyphenols in Jabuticaba (*Plinia* spp.) peel flours: Extraction and comparative evaluation of FTIR and HPLC for quantification of individual compounds. **Foods**, v. 12, n. 7, 2023. <https://doi.org/10.3390/foods12071488>

RIBEIRO, A. P. O. *et al.* Development of a probiotic non-fermented blend beverage with juçara fruit: Effect of the matrix on probiotic viability and survival to the gastrointestinal tract. **LWT – Food Science and Technology**, v. 118, 2020. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2019.108756>

RODRIGUES, N. P. A.; GARCIA, E. F.; DE SOUZA, E. L. Selection of lactic acid bacteria with promising probiotic aptitudes from fruit and ability to survive in different food matrices. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 52, 2021. <https://doi.org/10.1007/s42770-021-00543-x>

RODRIGUÉZ, L. G. R. *et al.* Fruits and fruit by-products as sources of bioactive compounds. Benefits and trends of lactic acid fermentation in the development of novel fruit-based functional beverages. **Food Research International**, v. 140, 2021. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2020.109854>

RODRÍGUEZ-MENA, A. *et al.* Coloring potential of anthocyanins from purple sweet potato paste: Ultrasound-assisted extraction, enzymatic activity, color and its application in ice pops. **Food Chemistry Advances**, v. 3, 2023.

RODRÍGUEZ-SOJO, M. J. *et al.* *Limosilactobacillus fermentum* CECT5716: Mechanisms and therapeutic insights. **Nutrients**, v. 12, 2021. <https://doi.org/10.3390/nu13031016>

ROMANO, N. *et al.* Role of mono and oligosaccharides from FOS as stabilizing agents during freeze-drying and storage of *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*. **Food Research International**, v. 90, 2016. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2016.11.003>

ROSA, R. G. *et al.* Sustainable bioprocess combining subcritical water pretreatment followed by anaerobic digestion for the valorization of jabuticaba (*Myrciaria cauliflora*) agro-industrial

by-product in bioenergy and biofertilizer. **Fuel**, v. 334, 2023. [https://doi-org.ez15.periodicos.capes.gov.br/10.1016/j.fuel.2022.126698](https://doi.org.ez15.periodicos.capes.gov.br/10.1016/j.fuel.2022.126698)

ROSALES, T. K. O. *et al.* Nanotechnology as a tool to mitigate the effects of intestinal microbiota on metabolization of anthocyanins. **Antioxidants**, v. 11, 2022. <https://doi.org/10.3390/antiox11030506>

RUFINO, M. S. M. *et al.* **Metodologia Científica**: determinação da atividade antioxidante total em frutas pelo método de redução do ferro (FRAP). Comunicado Técnico: Embrapa, v. 125, p. 1-4, 2006.

SALAS-MILLÁN, J. A.; AGUAYO, E. Fermentation for Revalorisation of Fruit and Vegetable By-Products: A Sustainable Approach Towards Minimising Food Loss and Waste. **Foods**, v. 13, 3680, 2024. <https://doi.org/10.3390/foods13223680>

SALEH, S. R. *et al.* Dual prophylactic/therapeutic potential of date seed, and nigella and olive oils-based nutraceutical formulation in rats with experimentally-induced Alzheimer's disease: A mechanistic insight. **Journal of Chemical Neuroanatomy**, v. 110. 2020. <https://doi.org/10.1016/j.jchemneu.2020.101878>.

SAMPAIO, K. B. *et al.* Development and in vitro evaluation of novel nutraceutical formulations composed of *Limosilactobacillus fermentum*, quercetin and/or resveratrol. **Food Chemistry**, v. 342, n. 16, 2021. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2020.128264>.

SANCHEZ, M. G. *et al.* Insights into the mechanisms of *L. salivarius* CECT5713 resistance to freeze-dried storage. **Cryobiology**, v. 112, 2023. <https://doi.org/10.1016/j.cryobiol.2023.104556>

SANTOS, B. A. *et al.* Jabuticaba peel extract and nisin: A promising combination for reducing sodium nitrite in Bologna-type sausages. **Meat Science**, v. 204, 2023. <https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2023.109273>

SCIBISZ, I.; ZIARNO, M. Effect of yogurt addition on the stability of anthocyanin during cold storage of strawberry, raspberry, and blueberry smoothies. **Foods**, v. 12, 2023. <https://doi.org/10.3390/foods12203858>.

SEGUENKA, B. *et al.* Ultrasound-assisted extraction and concentration of phenolic compounds from jabuticaba sabará (*Plinia peruviana* (Poir.) Govaerts) peel by nanofiltration membrane. **Food Chemistry**, v. 453, 2024. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2024.139690>

SERAGLIO, S. K. T. *et al.* Nutritional and bioactive potential of Myrtaceae fruits during ripening. **Food Chemistry**, v. 239, 2018. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2017.06.118>.

SHAH, A. *et al.* β -Glucan from mushrooms and dates as a wall material for targeted delivery of model bioactive compound: Nutraceutical profiling and bioavailability. **Ultrasonics Sonochemistry**, v. 82, 2022. <https://doi.org/10.1016/j.ultsonch.2021.105884>.

SIDDIQUI, S. A. *et al.* Phytochemicals and bioactive constituents in food packaging - A systematic review. **Heliyon**, v. 9, 2023. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2023.e21196>

- SILVA, R. D. C. S. *et al.* Synergistic effects evaluation of jaboticaba and strawberry extracts on oxidative stability of pork burgers. **Meat Science**, v. 219, 2025. <https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2024.109685>
- SILVA, N. C. *et al.* Spray-Dried Jaboticaba Powder as Food Resource. **Resources**, v. 13, 102, 2024. <https://doi.org/10.3390/resources13080102>
- SILVA, J. Y. P. *et al.* Revealing the potential impacts of nutraceuticals formulated with freeze-dried jaboticaba peel and *Limosilactobacillus fermentum* strains candidates for probiotic use on human intestinal microbiota. **Probiotics and Antimicrobial Proteins**, 2023a. <https://doi.org/10.1007/s12602-023-10134-x>
- SILVA, M. P. *et al.* Vacuum-assisted biosorption for developing combined delivery formulations of live probiotics and plant-phenolic compounds and their in-vitro evaluation. **Food Bioscience**, v. 54, 2023b. <https://doi.org/10.1016/j.fbio.2023.102732>
- SOARES, E. *et al.* Jaboticaba (*Myrciaria jaboticaba*) powder consumption improves the metabolic profile and regulates gut microbiome composition in high-fat diet-fed mice. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 144, 2021. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2021.112314>.
- SOSNOWSKA, D.; PODSEDEK, A.; KUCHARSKA, A. Z. Proanthocyanidins as the main pancreatic lipase inhibitors in chokeberry fruits. **Food & Function**, v. 10, 2022. <https://doi.org/10.1039/D1FO04429J>
- SOUZA, E. L. *et al.* 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**, v. 59, n. 10, p. 1645-1659, 2019. <https://doi.org/10.1080/10408398.2018.1425285>
- SUBBIAH, V. *et al.* In vitro digestion and colonic fermentation of phenolic compounds and their antioxidant potential in Australian beach-cast seaweeds. **Scientific Reports**, v. 14, 2024. <https://doi.org/10.1038/s41598-024-54312-5>.
- SULERIA, H. A. R. *et al.* Marine-based nutraceuticals: an innovative trend in the food and supplement industries. **Marine Drugs**, v. 13, p. 6336-6351, 2015. <https://doi.org/10.3390/md13106336>.
- NISHIMOTO-SAUCE, D. *et al.* Biopolymer nanoparticles: A strategy to enhance stability, bioavailability, and biological effects of phenolic compounds as functional ingredients. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 102, 2022. <https://doi.org/10.1002/jsfa.11512>
- TAVERNITI, V. *et al.* Combination of different probiotics and berry-derived (poly)phenols can modulate immune response in dendritic cells. **Journal of Functional Foods**, v. 94, 2022. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2022.105121>
- TRINDADE, P. L. *et al.* Consumption of phenolic-rich jaboticaba (*Myrciaria jaboticaba*) powder ameliorates obesity-related disorders in mice. **British Journal of Nutrition**, v. 127, 2022. <https://doi.org/10.1017/S0007114521001136>.

UN NISA, R. *et al.* Plant phenolics with promising therapeutic applications against skin disorders: A mechanistic review. **Journal of Agriculture and Food Research**, v. 16, 2024.

USMAN, I. *et al.* Phytochemicals in plant food waste: Innovative insight and implications. **Journal of Agriculture and Foods Research**, v. 20, 2025. <https://doi.org/10.1016/j.jafr.2025.101779>

VEREDIANO, T. A. *et al.* Effects of Anthocyanin on intestinal health: A systematic review. **Nutrients**, v. 13, 2021. <https://doi.org/10.3390/nu13041331>

VILVERT, J. C. *et al.* Phenolic compounds in acerola fruit and by-products: an overview on identification, quantification, influencing factors, and biological properties. **Journal of Food Measurement and Characterization**, v. 18, 2024. <https://doi.org/10.1007/s11694-023-02175-1>

WANG, Z. *et al.* Formation of viable, but putatively non-culturable (VPNC) cells of beer-spoilage lactobacilli growing in biofilms. **LWT - Food Science and Technology**, v. 133, 2020. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2020.109964>.

WANG, C. *et al.* The Principle of Steam Explosion Technology and Its Application in Food Processing By-Products. **Foods**, v. 13, 2024. <https://doi.org/10.3390/foods12173307>

WARD, K. R.; MATEJTSCHUK, P. The principles of freeze-drying and application of analytical technologies. **Methods in Molecular Biology**, 2021. https://doi.org/10.1007/978-1-0716-0783-1_3

WIBISONO, D. A. S. *et al.* Advancing Industrial Food Byproduct Management: Strategies, Technologies, and Progress in Waste Reduction. **Processes**, v. 13, 2025. <https://doi.org/10.3390/pr13010084>

WU, S. B.; LONG, C.; KENNELLY, E. J. Phytochemistry and health benefits of jaboticaba, an emerging fruit crop from Brazil. **Food Research International**, v.54, p. 148-159, 2013. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2013.06.021>.

XUE, H. *et al.* Factors affecting the stability of anthocyanins and strategies for improving their stability: A review. **Food Chemistry: X**, v. 24, 2024. <https://doi.org/10.1016/j.fochx.2024.101883>

YI GUO, M. D. *et al.* A dose-response evaluation of purified anthocyanins on inflammatory and oxidative biomarkers and metabolic risk factors in healthy young adults: A randomized controlled trial. **Nutrition**, v. 74, 2020. <https://doi.org/10.1016/j.nut.2020.110745>.

ZHOU, L. *et al.* Antioxidant activity of high purity blueberry anthocyanins and the effects on human intestinal microbiota. **LWT – Food Science and Technology**, v. 117, 2020. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2019.108621>.

ZHOU, H. *et al.* Fermentation of *Rosa roxburghii* Tratt by *Limosilactobacillus fermentum* NCU001464: Physicochemical characteristics and biological activity. **Food Bioscience**, v.55, 2023. <https://doi-org.ez15.periodicos.capes.gov.br/10.1016/j.fbio.2023.103038>

ZHOU, Z. *et al.* Relationship of Gene-Structure–Antioxidant Ability of Exopolysaccharides Derived from Lactic Acid Bacteria: A Review. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 71, p. 9187-9200, 2023.

APÊNDICES

APÊNDICE A – ARTIGO ORIGINAL I (<https://doi.org/10.1007/s42770-024-01576-8>)

Brazilian Journal of Microbiology (2025) 56:23–38
<https://doi.org/10.1007/s42770-024-01576-8>



BIOTECHNOLOGY AND INDUSTRY - RESEARCH PAPER



Thermal and storage stability of novel nutraceuticals combining potential probiotic *Limosilactobacillus fermentum* strains and freeze-dried jabuticaba [*Myrciaria cauliflora* (Mart.) O. Berg] peel

Heloisa Maria Almeida do Nascimento¹ · Jaelison Yandro Pereira da Silva¹ · Sônia Paula Alexandrino de Oliveira¹ · Karoliny Brito Sampaio¹ · Mariana Monteiro² · Fábio Santos de Souza³ · Eliton Souto de Medeiros⁴ · Thatyane Mariano Rodrigues de Albuquerque¹ · Evandro Leite de Souza^{1,5}

Received: 3 July 2024 / Accepted: 21 November 2024 / Published online: 2 December 2024
 © The Author(s) under exclusive licence to Sociedade Brasileira de Microbiologia 2024

Abstract

This study evaluated the stability of novel nutraceuticals containing jabuticaba freeze-dried peel (FJP) and a mix of potential probiotic *L. fermentum* strains [139, 263 and 296 (LfM)] (JM: FJP + LfM; JFM: FJB + LfM + fructooligosaccharides) through determination of thermal stability, viable cell counts, bacterial physiological status, phenolic compound contents, and antioxidant activity during 90 days of storage (11% relative humidity, 4 and 25 °C). JM and JFM were thermally stable, with satisfactory stability in temperature variations. JFM had higher *L. fermentum* viable cell counts than JM during storage. However, the physiological status of *L. fermentum* cells in JM and JFM indicated maintenance of vitality and functionality rather than death, regardless of the storage temperature. JM and JFM had a high content of phenolic acids and anthocyanins and antioxidant activity during storage. JFM stored under refrigeration had the most outstanding stability and potential functionality regarding the high viable probiotic cell counts, phenolic compound content, and antioxidant activity.

Keywords Nutraceutical · Probiotic · Phenolic compounds · Antioxidant activity · Long-term storage · Stability

Introduction

Nutraceuticals emerge from combining bioactive compounds with nutritional and pharmaceutical characteristics, positively impacting human health [1, 2]. Phenolic compounds and probiotics have received increasing attention for their combined use in developing nutraceuticals [3, 4] since, in addition to inducing benefits to human health, phenolic compounds could help survival and stimulate the metabolic activity of probiotics [5]. Furthermore, probiotics can utilize phenolic compounds and release metabolites with greater bioaccessibility and bioactivity [6].

Jabuticaba [*Myrciaria cauliflora* (Mart.) O. Berg] is a native plant from the Brazilian Atlantic Forest biome. Jabuticaba fruit, especially its peel, contains high amounts of dietary fiber and phenolic compounds, standing out the contents of soluble dietary fiber, cyanidin-3-*O*-glucoside, delphinidin-3-*O*-glucoside (anthocyanins), and ellagic and gallic acids (phenolic acids) [7, 8], with potent antioxidant capacity and reported beneficial effects on cardiometabolic parameters, lipid profile, and intestinal microbiota [9–15].

Communicated by Kalliopi Rantsiou

✉ Evandro Leite de Souza
 els@academico.ufpb.br

¹ Department of Nutrition, Health Sciences Center, Federal University of Paraíba, João Pessoa, PB, Brazil

² Laboratory of Functional Foods, Josué de Castro Institute of Nutrition, Federal University of Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, RJ, Brazil

³ Laboratory of Quality Control of Medicines, Department of Pharmaceutical Sciences, Health Sciences Center, Federal University of Paraíba, João Pessoa, PB, Brazil

⁴ Laboratory of Materials and Biosystems, Center of Technology, Federal University of Paraíba, João Pessoa, PB, Brazil

⁵ Centro de Ciências da Saúde, Departamento de Nutrição, Universidade Federal da Paraíba, Campus I – Cidade Universitária, João Pessoa, PB CEP: 58051-900, Brazil

Jabuticaba fruit is highly perishable and transforming it into a more stable powdered material could preserve most of these bioactive compounds [16], besides producing a functionalized and circular ingredient with added value to formulate nutraceuticals [17].

Using multiple probiotic strains in combination to formulate nutraceuticals could enhance the overall benefits to human health compared to using one probiotic strain solely [6, 18]. Early studies have reported the functionalities of a mix of *Limosilactobacillus fermentum* strains (139, 263, and 296) in alleviating oxidative stress, improving intestinal microbiota composition, and producing active metabolites. *L. fermentum* mix also ameliorates several parameters linked to decreased risk of cardiometabolic disorders and shows low toxicity in vivo [13, 19, 20].

An early study developed nutraceuticals combining a mix of potential probiotic *L. fermentum* strains (139, 263, and 296) and freeze-dried jabuticaba peel, which showed positive impacts on the composition and metabolic activity of human intestinal microbiota during an in vitro colonic fermentation. These effects were mainly linked to the high *L. fermentum* viable cell counts, phenolic profile, and antioxidant activity detected in the examined nutraceuticals after freeze-drying [17]. However, the efficacy of nutraceuticals to promote health benefits can be affected by stability changes resulting from variations in processing and storage conditions [21, 22].

This study evaluated the thermal and storage stability of these novel nutraceuticals formulated with a mix of potential probiotic *L. fermentum* strains (139, 263, and 296) and jabuticaba freeze-dried peel.

Materials and methods

L. fermentum strains and inoculum preparation

Three *L. fermentum* strains were used to formulate the nutraceuticals, namely *L. fermentum* 139, *L. fermentum* 263, and *L. fermentum* 296. These strains were isolated from fruit processing by-products and characterized as probiotic candidates in previous in vitro and in vivo studies [13, 17, 23–25]. Initially, each strain was cultivated (37 ± 1 °C, 24–48 h) separately in de Man, Rogosa, and Sharpe (MRS) broth (HiMedia, Mumbai, India) under anaerobiosis (AnaeroGen, Oxoid, Basingstoke, England) to reach the growth stationary phase. The cultures were centrifuged (1696 $\times$ g, 10 min, 4 °C) and washed with sterile saline (NaCl, 0.85%, p/v), resuspended in sterile distilled water, and mixed in equal proportions (1:1:1, v/v) to obtain a cell suspension with an optical density reading at 625 nm (OD₆₂₅) of 2.5 and viable

cell counts of approximately 10 log CFU/mL when plated on MRS agar (HiMedia).

Preparation of nutraceuticals

Two different nutraceuticals were prepared: (i) a mix of the three *L. fermentum* strains (72 mL)+freeze-dried jabuticaba peel (13 g), termed JM; and (ii) a mix of the three *L. fermentum* strains (72 mL)+freeze-dried jabuticaba peel (13 g)+fructooligosaccharides (FOS, 20% w/v, Sigma-Aldrich), termed JFM. The amount of freeze-dried jabuticaba peel used to prepare the nutraceuticals was selected considering the lowest daily dose of anthocyanins that could promote health benefits according to results from clinical trials, besides being safe for human consumption [26, 27]. The nutraceuticals were frozen (-80 °C, 24 h), freeze-dried (freeze-dryer Liotop, Model L-101, São Carlos, SP, Brazil; temperature -53 ± 2 °C, vacuum pressure < 170 µHg, freeze-drying speed 1 mm/h, 30 h) [28], distributed aseptically into open disposable Petri dishes and stored at 4 ± 0.5 and 25 ± 0.5 °C for 15 days (humidification period) in hermetically closed desiccators under protection from light and containing saturated lithium chloride (LiCl) solution (20 g LiCl/5 mL distilled water) (Sigma Aldrich) to achieve 11% relative humidity and water activity (a_w) of 0.19 and 0.17 for JFM and JM when stored under refrigeration, respectively; and of 0.21 and 0.22 for JFM and JM when stored under room temperature, respectively. The a_w was determined with a digital hygrometer (Aqualab 3TE, Decagon Pullman, WA, USA) operating at room temperature (25 ± 0.5 °C). After the humidification period, the plates were closed, kept in desiccators with controlled relative humidity (RH) (11%), and stored under refrigeration (4 ± 0.5 °C) and room temperature (25 ± 0.5 °C) for 90 days.

Thermal analysis of nutraceuticals

Differential scanning calorimetry (DSC) and thermogravimetry (TG) curves were determined on day 15 of the humidification period (11% RH). DSC measurements were performed with a thermal analyzer (model DSC-50, Shimadzu, Kyoto, Japan), where approximately two mg of each nutraceutical was placed in a hermetically sealed aluminum crucible and subjected to heating (10 °C/min) until reaching 450 °C under a nitrogen atmosphere (flow rate: 50 mL/min). TG curves were obtained using a calorimeter (model TGA-50, Shimadzu), where approximately five mg of the examined nutraceutical was weighed in an alumina crucible and subjected to heating (10 °C/min) until reaching 900 °C under a synthetic air atmosphere (flow rate: 20 mL/min). The curves were obtained using Tassys Software in a single repetition [29].

Evaluation of the stability of nutraceuticals

The stability of the nutraceuticals was evaluated considering the a_w , solubility, and hygroscopicity determined immediately before the humidification period and on days zero, 15, 30, 60, and 90 of refrigerated (4 ± 0.5 °C) and room temperature storage (25 ± 0.5 °C). The a_w was determined with a digital hygrometer (Aqualab 3TE) operating at room temperature (25 ± 0.5 °C).

Determination of the solubility of nutraceuticals

An aliquot (one g) of the examined nutraceutical was weighed (dry basis), diluted in distilled water (100 mL), homogenized for five min, dispensed in Falcon tubes (50 mL), and centrifuged ($954 \times g$, 5 min, 4 ± 0.5 °C). An aliquot (25 mL) of the supernatant was transferred to a Petri dish and dried in an oven (105 °C, 24 h). The solubility (%) was calculated based on the weight difference before and after drying using the equation [30].

$$\text{Solubility (\%)} = (\text{MS}/\text{MT}) \times 100 \quad (1)$$

Where MS is the supernatant mass, and MT is the total mass. The result was expressed as a percentage (%) of the solubility capacity.

Determination of the hygroscopicity of nutraceuticals

An aliquot (one g) of the examined nutraceutical was weighed in Petri dishes, placed inside a desiccator containing a saturated NaCl solution (relative humidity of approximately 75.29%, 25 ± 0.5 °C), kept in a temperature-controlled chamber (BOD, 25 ± 0.5 °C, seven days), and daily weighted until reaching hygroscopic balance. The hygroscopicity was expressed as g of water adsorbed per 100 g dry mass [31].

Evaluation of ultrastructural characteristics of nutraceuticals

The ultrastructural characteristics of the examined nutraceuticals were evaluated using a scanning electron microscope (Model TM-1000, Hitachi, Tokyo, Japan) at days zero and 90 of refrigerated (4 ± 0.5 °C) and room temperature storage (25 ± 0.5 °C) [28]. The microscope operated under an acceleration voltage of 15 kV, with a backscattered electron detector, spatial resolution of up to 30 nm, and magnifications of 50x to 10000x. Before scanning electronic

microscopy analysis, the nutraceutical samples were metalized with a thin gold layer as organic materials with low conductivity.

Enumeration of viable cell counts of *L. fermentum* in the nutraceuticals

The viable cell counts of *L. fermentum* in the nutraceuticals were determined immediately after the freeze-drying and the humidification period and on days zero, 15, 30, 60, and 90 of refrigerated (4 ± 0.5 °C) and room temperature storage (25 ± 0.5 °C). Freeze-dried nutraceuticals (approximately 0.5 g) were rehydrated with sterile distilled water (3 mL, 25 ± 0.5 °C) for 15 min. Serial dilutions (1:9, v/v) were done with a sterile saline solution (NaCl, 0.85 g/100 mL), and aliquots (100 µL) of these dilutions were plated (drop plate technique) on MRS agar and incubated anaerobically (AnaeroGen, 37 ± 0.5 °C, 48 h). The visible colonies were enumerated at the end of the incubation period, and the results were expressed as log CFU/g [28]. The detection limit of the plate count test was 2 log CFU/g.

Determination of the physiological status of *L. fermentum* cells in the nutraceuticals

The sizes of the subpopulations of *L. fermentum* cells in the nutraceuticals with different physiological status were measured with flow cytometry technique at days zero, 15, 30, 60, and 90 of refrigerated (4 ± 0.5 °C) and room temperature storage (25 ± 0.5 °C). The nutraceuticals were washed twice with PBS by centrifugation ($4500 \times g$, 10 min, 4 °C), followed by a 15 min incubation in the dark for staining with propidium iodide (PI, Sigma-Aldrich, 10 µg/mL) and carboxyfluorescein diacetate (cFDA, Sigma-Aldrich, 2.5 µg/mL). After the staining procedures, the cell suspensions were washed with an equal volume of PBS by centrifugation ($4500 \times g$, 10 min, 4 °C) to remove excess dye. PI and cFDA staining were used to evaluate cytoplasmic membrane integrity and enzymatic activity in the cells, respectively [32]. Flow cytometry analysis was conducted using a flow cytometer with argon laser emission at 488 nm and 640 nm (BD Accuri C6, Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ, USA), containing two light scattering detectors (FSC and SSC) and four fluorescence detectors. FL1 channel, detecting light with a wavelength of $533 \text{ nm} \pm 30 \text{ nm}$, collected green fluorescence to verify cFDA labeling, while FL3 channel, detecting light with wavelengths $> 670 \text{ nm}$, collected red fluorescence to verify PI labeling. 10,000 events were read per sample with automatic compensation for the obtained data. The bacterial population was identified from an FSC versus SSC density plot, and the staining results were plotted in a specific region of the FL1 versus

FL3 plot. The quadrants (gates) were used to identify the cell subpopulation according to the fluorescence readings based on the dye used. In the double staining with PI and cFDA, the cell subpopulations were characterized as PI-cFDA+, considered non-permeabilized cells with enzymatic activity; and PI+cFDA–, considered permeabilized cells without enzymatic activity; and PI+cFDA+, considered injured cells with enzymatic activity [32–34]. Data analysis was performed with BD Accuri C6 software (Becton Dickinson). The results were expressed as the size (%) of the cell subpopulations with different physiological status.

Determination of phenolic compounds in the nutraceuticals

The extraction of soluble and total phenolic compounds (soluble and insoluble phenolic compounds) from nutraceuticals was performed at days zero, 15, 30, 60, and 90 of refrigerated (4 ± 0.5 °C) and room temperature storage (25 ± 0.5 °C) using a previously described procedure [8, 17]. The contents of anthocyanins (cyanidin-3-*O*-glucoside and delphinidin-3-*O*-glucoside) and phenolic acids (ellagic acid and gallic acid), the most prevalent phenolic compounds in jaboticaba peel [8, 17, 35], were determined with high-performance liquid chromatography technique using a liquid chromatograph system (Shimadzu®, Japan) with two parallel pumps LC-20AD, automatic injector SIL-20AHT, system controller CBM-20 A, degasser DGU-20A5, and diode-array detector (DAD) SPD-M20A. Chromatographic separation of anthocyanins was achieved using a reverse-phase column C18 (5 µm, 150 mm × 4.6 mm, Phenomenex®), and chromatographic separation of gallic acid and ellagic acid was achieved using a Poroshell 120 EC-C18 column (2.7 µm, 100 mm × 3 mm, Agilent Technologies) and analytical conditions previously described (Inada et al., 2020). Anthocyanins, gallic acid, and ellagic acid were monitored at 530 nm, 280 nm, and 360 nm, respectively. The identification was performed by comparing retention time and the absorption spectrum of the respective standards (Sigma-Aldrich), and the quantification was performed by external calibration. The results were expressed as mg/100 g.

Determination of the antioxidant activity of nutraceuticals

The antioxidant activity of the nutraceuticals was determined with 2,2-azino-bis-3-ethylbenzthiazoline-6-sulfonic acid (ABTS), 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH), and ferric reducing antioxidant power (FRAP) methods on days zero, 15, 30, 60, and 90 of refrigerated (4 ± 0.5 °C) and room temperature storage (25 ± 0.5 °C). An aliquot (two g) of the examined nutraceutical was homogenized with

70% methanol (10 mL, Sigma-Aldrich) and remained at rest for 24 h under refrigeration (4 ± 0.5 °C). The ability of the extract to capture the ABTS•+ radical was measured with the ABTS method. The ABTS radical was prepared in potassium persulfate (final concentration of 2.45 mM) and allowed to stand for 12–16 h under room temperature (25 ± 0.5 °C) in the dark and diluted in distilled water to an absorbance value of 0.7 (± 0.02) at 734 nm. A control solution with extracting solvent (100 µL) + ABTS radical (500 µL) was prepared. For the determination of DPPH scavenging activity, a DPPH• (Sigma-Aldrich) radical stock solution was initially prepared (24 mg diluted in 100 mL of absolute ethyl alcohol), from which a working solution was generated (1:10 in absolute ethyl alcohol v/v). Aliquots of the extracts were homogenized with DPPH• working solution and kept at rest for 30 min [29]. The results of ABTS and DPPH methods were estimated using a standard Trolox curve (50–2000 µM), and the results were expressed in Trolox µmol equivalent per gram of sample (µmol/g). The ability of the extracts to reduce iron was measured using the FRAP method [35]. The antioxidant activity was estimated using a standard ferrous sulfate curve (50–2000 µM), and the results were expressed as µM ferrous sulfate per gram of sample (µmol FeSO₄/g). Absorbance measurements for ABTS•+, DPPH•, and FRAP methods were made with a microplate spectrophotometer (BioTek Eon, Winooski, VT, USA) at 734, 517 and 595 nm, respectively.

Statistical analysis

The experiments were conducted in triplicate on three independent occasions, and the results were expressed as average $\pm$ standard deviation. The difference between the obtained data was determined using the Analysis of Variance (ANOVA) followed by Tukey's test, considering a 5% significance level ($p \leq 0.05$). A principal component analysis (PCA) and Pearson's correlation test evaluated the relationship between the dependent variables. Sigma Stat 3.5 (Jandel Scientific Software, San Jose, CA, USA) and R software (Version 2.15.3, Ross Ihaka & Robert Gentleman, University of Auckland, Auckland, New Zealand) were used to perform the statistical analysis.

Results

DSC and TG analysis of the nutraceuticals

The TG and DSC curves of FOS were determined to identify its thermal behavior (endothermic peaks and mass loss). Subsequently, the thermal behavior of JM and JFM were determined. The DSC curve of FOS showed two

endothermic peaks at 65.59 and 209.47 °C (Fig. 1A), and the TG curve showed mass loss between 84.69 and 128.64 °C (2.4%), 193.73 and 306.94 °C (43.6%), and 321.58 and 520.19 °C (21%) (Fig. 1B).

The DSC curve of JM stored under refrigeration showed endothermic peaks at 68.96 and 209.47 °C (Fig. 1A), and the TG curve showed mass loss between 116.7 and 281.5 °C (29.86%), 305.5 and 377.98 °C (13.03%), and 558.78 and 873.88 °C (21.32%) (Fig. 1B). JM stored under room temperature showed endothermic peaks at 56.03, 115.56, 147.15, and 239.64 °C (Fig. 1A). The TG curve of JM stored under room temperature showed mass loss between 57 and 126.63 °C (9.3%), 138.02 and 228.6 °C (16.36%), 240.47 and 399.45 °C (25.84%), and 443.91 and 626.72 °C (17.48%) (Fig. 1B).

The DSC curve of JFM stored under refrigeration showed endothermic peaks at 118.33, 136.58, and 180.64 °C (Fig. 1A), and the TG curve showed mass loss between 67.1 and 134.13 °C (4.68%), 163.86 and 258.8 °C (29.39%), and 297.43 and 389.57 °C (14.53%) (Fig. 1B). JFM stored under room temperature showed endothermic peaks at 110.83, 122.67, and 183.67 °C (Fig. 1A), and mass loss between 52.38 and 116.63 °C (7.0%), 152.92 and 261.94 °C (31.37%), and 395.26 and 649.75 °C (20.11%) (Fig. 1B).

Stability of the nutraceuticals during storage

The a_w of JM and JFM varied from 0.145 ± 0.01 to 0.183 ± 0.01 and 0.159 ± 0.01 to 0.179 ± 0.01 during the 90 days of refrigerated storage (11% RH), respectively, while these values varied from 0.116 ± 0.01 to 0.215 ± 0.01 and 0.129 ± 0.01 to 0.211 ± 0.02 when the nutraceuticals were stored under room temperature, respectively (Table 1). The a_w of JM and JFM did not differ on days 15, 30, and 60 of refrigerated and room temperature storage ($p > 0.05$). The

a_w of JM and JFM overall reduced on day 90 of refrigerated and room temperature storage compared to day zero ($p \leq 0.05$), except in JFM stored under refrigeration, where the a_w on days zero and 90 did not differ (0.179 ± 0.01 and 0.159 ± 0.01 , respectively) ($p > 0.05$).

The solubility of JM and JFM decreased during refrigerated and room temperature storage (11% RH) (Table 1). JM stored under refrigeration and room temperature had solubility of $14.18 \pm 0.52\%$ and $13.98 \pm 0.60\%$ on day zero, respectively, with a reduction to $12.02 \pm 0.25\%$ and $10.99 \pm 0.34\%$ on day 90 of storage ($p \leq 0.05$). Similarly, JM stored under refrigeration and room temperature had solubility of $23.41 \pm 0.67\%$ and $20.89 \pm 0.66\%$ on day zero, respectively, with a reduction to $18.08 \pm 0.96\%$ and $18.48 \pm 0.49\%$ on day 90 of storage ($p \leq 0.05$). Although the solubility of JM and JFM differed during storage ($p \leq 0.05$), it did not differ for each nutraceutical stored under refrigeration and room temperature ($p > 0.05$).

The hygroscopicity, i.e. water absorption capacity, of JM and JFM increased during storage (11% RH), with JFM having the highest solubility ($p \leq 0.05$). JFM stored under refrigeration and room temperature had a hygroscopicity of $30.90 \pm 0.34\%$ and $28.60 \pm 0.56\%$ on day zero, respectively, with an increase to $34.11 \pm 0.88\%$ and $32.40 \pm 0.70\%$ on day 90 of storage ($p \leq 0.05$). The hygroscopicity of JM did not differ between day zero and 90 of storage under refrigeration and room temperature ($p > 0.05$). The hygroscopicity of JM was $21.26 \pm 0.93\%$ and $20.10 \pm 0.93\%$ on day zero of refrigerated and room temperature storage, respectively, and these values increased to $20.67 \pm 0.82\%$ and $20.31 \pm 0.69\%$ on day 90 of refrigerated and room temperature storage, respectively ($p > 0.05$).

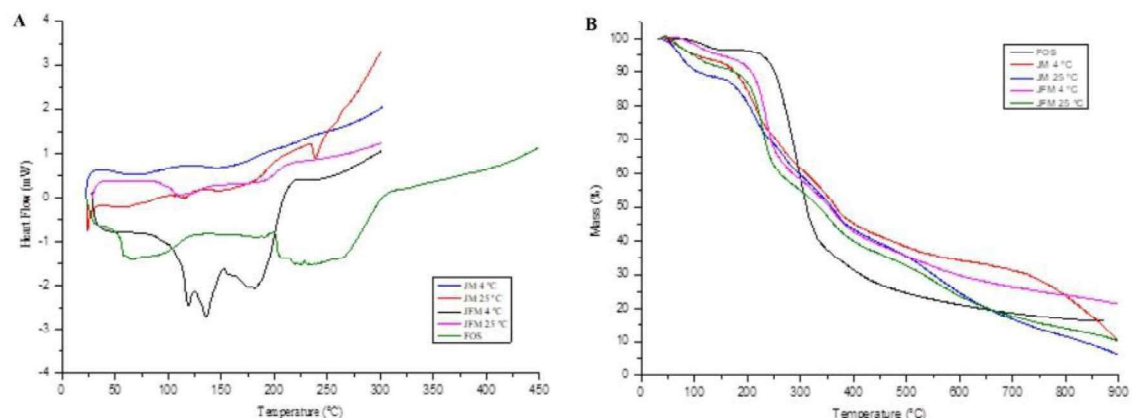


Fig. 1 DSC (A) and TG (B) curves of JM, JFM, and fructooligosaccharides (FOS) at the beginning of storage under controlled humidity conditions (11% RH). JM: *L. fermentum* mix + freeze-dried jabuticaba peel; JFM: *L. fermentum* mix + freeze-dried jabuticaba peel + fructooligosaccharides

Table 1 Water activity (a_w), solubility, and hygroscopicity (average $\pm$ standard deviation, $n=3$) in JM and JFM on days zero, 15, 30, 60 and 90 of storage under room and refrigerated temperature [RoT (25 ± 0.5 °C) and RefT (4 ± 0.5 °C), respectively]

Nutraceuticals	Storage condition	Storage				
		Day zero	Day 15	Day 30	Day 60	Day 90
a_w	JM	0.183 $\pm$ 0.01 ^{Aa}	0.174 $\pm$ 0.01 ^{Aba}	0.151 $\pm$ 0.01 ^{Bb}	0.153 $\pm$ 0.01 ^{Aba}	0.145 $\pm$ 0.01 ^{Bab}
	RoT	0.215 $\pm$ 0.01 ^{Aa}	0.188 $\pm$ 0.01 ^{Ba}	0.187 $\pm$ 0.01 ^{Aba}	0.139 $\pm$ 0.01 ^{Ca}	0.116 $\pm$ 0.01 ^{Cc}
JFM	RefT	0.179 $\pm$ 0.01 ^{Aa}	0.173 $\pm$ 0.01 ^{Aa}	0.162 $\pm$ 0.01 ^{Aab}	0.165 $\pm$ 0.01 ^{Aa}	0.159 $\pm$ 0.01 ^{Aa}
	RoT	0.211 $\pm$ 0.02 ^{Aa}	0.174 $\pm$ 0.01 ^{Ba}	0.174 $\pm$ 0.01 ^{Bab}	0.160 $\pm$ 0.01 ^{Bca}	0.129 $\pm$ 0.01 ^{Cbc}
Solubility	JM	13.98 $\pm$ 0.60 ^{Ac}	13.14 $\pm$ 0.14 ^{Ac}	12.09 $\pm$ 0.31 ^{Bc}	11.63 $\pm$ 0.14 ^{BCc}	10.99 $\pm$ 0.34 ^{Cb}
	RoT	14.18 $\pm$ 0.52 ^{Cc}	18.67 $\pm$ 0.28 ^{Ab}	13.76 $\pm$ 0.26 ^{CDc}	16.16 $\pm$ 0.56 ^{Bb}	12.02 $\pm$ 0.25 ^{Eb}
JFM	RefT	20.89 $\pm$ 0.66 ^{Ab}	19.69 $\pm$ 0.72 ^{Abab}	17.87 $\pm$ 0.86 ^{Cb}	19.18 $\pm$ 0.52 ^{Ba}	18.48 $\pm$ 0.49 ^{Bca}
	RoT	23.41 $\pm$ 0.67 ^{Aa}	20.95 $\pm$ 0.97 ^{Ba}	20.04 $\pm$ 1.03 ^{Bca}	18.65 $\pm$ 0.86 ^{Bca}	18.08 $\pm$ 0.96 ^{Ca}
Hygroscopicity	JM	21.26 $\pm$ 0.93 ^{Ac}	20.58 $\pm$ 0.86 ^{Ab}	22.69 $\pm$ 0.53 ^{Ac}	20.54 $\pm$ 0.12 ^{Ac}	20.67 $\pm$ 0.82 ^{Ab}
	RoT	20.10 $\pm$ 0.93 ^{Abc}	21.24 $\pm$ 0.89 ^{Ab}	15.42 $\pm$ 0.71 ^{Cd}	18.68 $\pm$ 0.61 ^{Bc}	20.31 $\pm$ 0.69 ^{Abb}
JFM	RefT	30.90 $\pm$ 0.34 ^{Bca}	32.36 $\pm$ 0.96 ^{Ba}	34.28 $\pm$ 0.62 ^{Aba}	35.07 $\pm$ 0.78 ^{Aa}	34.11 $\pm$ 0.88 ^{Aba}
	RoT	28.60 $\pm$ 0.56 ^{Bb}	30.97 $\pm$ 0.96 ^{Aa}	26.42 $\pm$ 0.40 ^{Cb}	30.67 $\pm$ 0.86 ^{Ab}	32.40 $\pm$ 0.70 ^{Aa}

JM: *L. fermentum* mix + freeze-dried jabuticaba peel; JFM: *L. fermentum* mix + freeze-dried jabuticaba peel + fructooligosaccharides

Note: A–E Different superscript capital letters in the same row denote differ ($p \leq 0.05$) based on Tukey's test; a–d: different superscript small letters in the same column for the same parameter differ ($p \leq 0.05$) based on Tukey's test

Ultrastructural characteristics of the nutraceuticals

The ultrastructural characteristics of JM and JFM were examined on days zero and 90 of refrigerated and room temperature storage (11% RH) using a scanning electron microscope with magnification up to 10,000x (Fig. 2). JM and JFM had intact *L. fermentum* cells trapped throughout their structures. However, JFM appeared to have a predominance of intact cells of *L. fermentum*, which were apparently trapped on day 90 of refrigerated and room temperature storage. Smooth surfaces were more prominent in JFM at day 90 of refrigerated storage. JM and JFM had visible elongated structures on their surfaces, indicating aggregation of *L. fermentum* cells.

Viable cell counts of *L. fermentum* in the nutraceuticals during storage

JM and JFM had viable cell counts of 12.39 ± 0.26 log CFU/g and 12.31 ± 0.19 log CFU/g before freeze-drying, respectively (data not shown), and these counts reduced to 9.55 ± 0.29 CFU/g and 9.82 ± 0.35 log CFU/g after freeze-drying (day zero), respectively ($p \leq 0.05$) (Table 2).

Table 2 shows the survival rates of the *L. fermentum* strains (139, 263, and 296) in JM and JFM under controlled storage conditions (11% RH) at refrigeration and room temperatures. During refrigerated storage, survival rates for *L. fermentum* in JM and JFM declined, ranging from 86.22 to 54.02% in JM and 92.61–68.60% in JFM, respectively.

Over the 90-day storage period, JM and JFM stored under refrigeration maintained the highest survival rates, with JFM showing the most significant values among the nutraceuticals tested. The lowest survival rate (47.89%) was detected in JM stored at room temperature.

Physiological status of *L. fermentum* cells in the nutraceuticals during storage

Figure 3 shows the sizes of *L. fermentum* cell subpopulations in JM and JFM with dual staining with PI and cFDA during 90 days of refrigerated and room temperature storage (11% RH). The live cell subpopulation (PI-cFDA+) decreased in JM and JFM during refrigerated and room temperature storage. On day 30 of storage, JM and JFM stored under refrigeration had larger live cell subpopulation sizes (13.59 ± 0.62 and $8.55 \pm 0.58\%$, respectively) than when stored under room temperature ($4.23 \pm 0.90\%$ and $2.78 \pm 0.65\%$, respectively) ($p \leq 0.05$). Similarly, on day 90 of storage, JFM and JM stored under refrigeration had larger live cell subpopulation sizes ($5.2 \pm 0.28\%$ and $4.42 \pm 0.60\%$, respectively) than when stored under room temperature ($2.10 \pm 0.27\%$ and 1.00 ± 0.36 , respectively) ($p \leq 0.05$).

The largest dead cell subpopulation sizes (PI+cFDA-) were detected on day 15 of refrigerated (JFM: $56.53 \pm 1.27\%$) and room temperature storage (JM: $60.20 \pm 1.59\%$; JFM: $65.47 \pm 1.89\%$). On day 90 of storage, JFM stored under refrigeration had the smallest dead cell subpopulation size ($18.93 \pm 1.53\%$) ($p \leq 0.05$), followed by JM stored under room temperature ($22.57 \pm 1.11\%$), JFM stored under

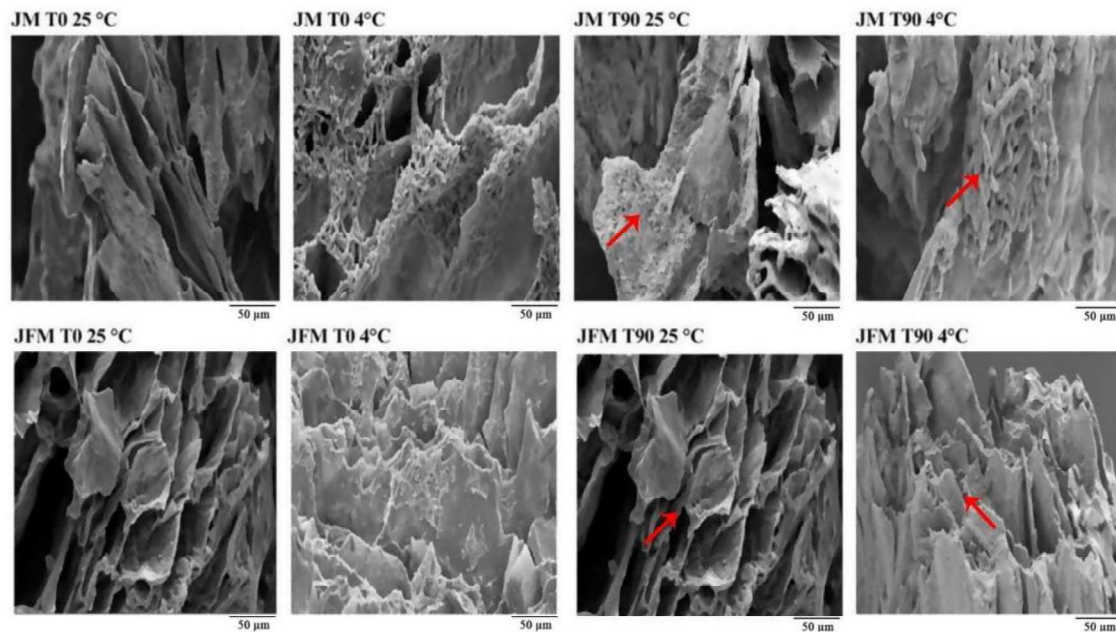


Fig. 2 Scanning electron micrograph of JM and JFM under controlled humidity (11% RH) on days zero (T0) and 90 (T90) of refrigerated and room temperature storage [RefT (4 ± 0.5 °C) and RoT

(25 ± 0.5 °C), respectively]. JM: *L. fermentum* mix + freeze-dried jabuticaba peel; JFM: *L. fermentum* mix + freeze-dried jabuticaba peel + fructooligosaccharides

Table 2 Survival rate (%; average $\pm$ standard deviation, $n = 3$) of *offimosilactobacillus fermentum* cells in JM and JFM on days zero, 15, 30, 60 and 90 of storage under room and refrigerated temperature [RoT (25 ± 0.5 °C) and RefT (4 ± 0.5 °C)]

Storage condition/ Formulation		Storage time				
		Day zero	Day 15	Day 30	Day 60	Day 90
JM	RefT	86.22 ± 0.48^{Aa}	84.43 ± 0.16^{Bb}	63.11 ± 0.17^{Cc}	55.28 ± 0.84^{Dac}	54.02 ± 0.15^{Cb}
	RoT	80.90 ± 0.35^{Ab}	78.49 ± 0.2^{Bc}	75.11 ± 0.02^{Bb}	49.22 ± 0.87^{Cc}	47.89 ± 0.36^{Cc}
JFM	RefT	92.61 ± 0.14^{Aa}	92.85 ± 0.18^{Ba}	75.13 ± 0.10^{Ca}	70.36 ± 0.28^{Ca}	68.60 ± 0.16^{Dca}
	RoT	90.67 ± 0.31^{Ab}	83.88 ± 0.27^{Bb}	75.08 ± 0.19^{Cab}	53.98 ± 0.08^{Db}	50.37 ± 0.12^{Dbc}

JM: *L. fermentum* mix + freeze-dried jabuticaba peel; JFM: *L. fermentum* mix + freeze-dried jabuticaba peel + fructooligosaccharides

Note: A–D Values in the same row before and after freeze-drying, as well as for different days of storage with different uppercase letters differ significantly, based on Tukey's test ($p \leq 0.05$); a–c Values in the same column for the different formulations and storage temperatures with different lowercase letters differ significantly ($p \leq 0.05$), based on Tukey's test

refrigeration ($51.67 \pm 1.25\%$), and JM stored under room temperature ($61.27 \pm 0.40\%$).

The largest injured cell subpopulation size (PI + CFDA+) on day 15 of storage was detected in JFM stored under refrigeration ($32.27 \pm 1.16\%$), on day 30 of storage was detected in JFM stored under room temperature ($35.23 \pm 2.00\%$). On day 90 of storage was detected in JM stored under refrigeration ($72.20 \pm 3.10\%$) ($p \leq 0.05$). The injured cell subpopulation sizes in JM and JFM differed on day 90 of room temperature storage ($1.00 \pm 0.36\%$ and $2.10 \pm 0.27\%$, respectively) ($p \leq 0.05$); however, the injured cell subpopulation sizes did not differ in JM and JFM stored under refrigeration (4.42 ± 0.60 and $5.2 \pm 0.28\%$, respectively) ($p > 0.05$).

The sizes of cell subpopulations with the same physiological status (live, injured, or dead) differed in JM and JFM on day zero and 90 of storage under the same temperature ($p \leq 0.05$), except for the sizes of dead cell subpopulation in JFM that did not differ on day zero and 90 of room temperature storage ($p > 0.05$).

Contents of phenolic compounds in the nutraceuticals during storage

Gallic acid, ellagic acid (hydroxybenzoic acid derivatives), cyanidin-3-*O*-glucoside, and delphinidin-3-*O*-glucoside (anthocyanins) were identified in JM and JFM during refrigerated and room temperature storage (11%

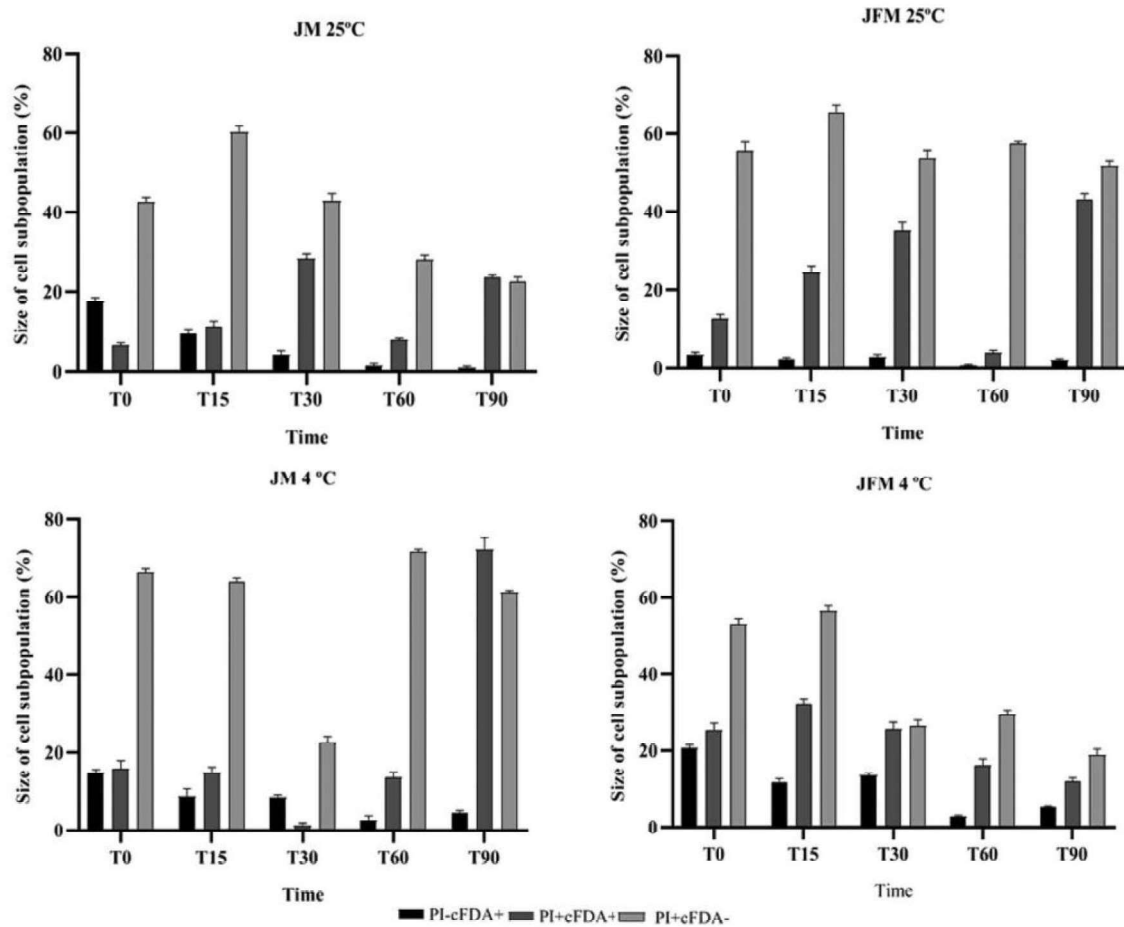


Fig. 3 Sizes (%; average $\pm$ standard deviation, $n=3$) of the cell subpopulation of *Limosilactobacillus fermentum* cells in JM and JFM during 90 days of refrigerated and room temperature storage [RefT (4 ± 0.5 °C) and RoT (25 ± 0.5 °C)]. JM: *L. fermentum* mix + freeze-dried jabuticaba peel; JFM: *L. fermentum* mix + freeze-dried jabuti-

caba peel + fructooligosaccharides. PI-cFDA+: non-permeabilized cells with enzymatic activity; PI+cFDA-: permeabilized cells without enzymatic activity; and PI+cFDA+, considered injured cells with enzymatic activity

RH) (Table 3). Cyanidin-3-*O*-glucoside was the most abundant phenolic compound in JM and JFM during refrigerated and room temperature storage (11% RH). JM had a higher content of cyanidin-3-*O*-glucoside than JFM on day zero and 90 of refrigerated and room temperature storage (1223.1 ± 6.1 – 1138.4 ± 0.9 mg/100 g and 613.8 ± 6.3 to 577.3 ± 16.5 mg/100 g, respectively) ($p \leq 0.05$). JM had a higher cyanidin-3-*O*-glucoside content on day 30 of refrigerated and room temperature storage (1256.1 ± 14.3 and 1276.7 ± 28.6 mg/100 g, respectively) than JFM (629.5 ± 12.2 and 659.7 ± 11.4 mg/100 g, respectively) ($p \leq 0.05$).

JM had higher contents of delphinidin-3-*O*-glucoside on day zero of refrigerated and room temperature storage (137.8 ± 3.8 and 131.0 ± 1.7 mg/100 g, respectively) than JFM (78.1 ± 2.1 and 71.2 ± 0.6 mg/100 g, respectively) ($p \leq 0.05$). The contents of delphinidin-3-*O*-glucoside in JM and JFM overall reduced over time regardless of the storage temperature ($p \leq 0.05$). The highest contents of delphinidin-3-*O*-glucoside were detected in JM on day 15 of refrigerated storage (149.2 ± 7.5 mg/100 g) and day 30 of room temperature storage (149.5 ± 4.2 mg/100 g) ($p \leq 0.05$). The contents of delphinidin-3-*O*-glucoside did not differ in JFM on day 90 of refrigerated and room temperature storage (64.4 ± 0.8 and 66.5 ± 1.3 mg/100 g, respectively)

Table 3 Contents of phenolic compounds (mg/100 g, average $\pm$ standard deviation, $n = 3$) in JM and JFM on days zero, 15, 30, 60 and 90 of refrigerated and room temperature storage [RefT (4 ± 0.5 °C) and RoT (25 ± 0.5 °C)]

Nutraceutical/Storage condition		Storage time				
		Day zero	Day 15	Day 30	Day 60	Day 90
Cyanidin-3- <i>O</i> -glucoside (mg/100 g)						
JM	RefT	1222.7 $\pm$ 34.8 ^{Aa}	1222.2 $\pm$ 58.4 ^{Aa}	1256.1 $\pm$ 14.3 ^{Ba}	1222.4 $\pm$ 41.6 ^{Ca}	1204.5 $\pm$ 41.7 ^{Da}
	RoT	1223.1 $\pm$ 6.1 ^{Aa}	1134.7 $\pm$ 28.1 ^{Ca}	1276.7 $\pm$ 28.6 ^{Aa}	1118.9 $\pm$ 23.5 ^{Bb}	1138.4 $\pm$ 0.9 ^{Bb}
JFM	RefT	633.7 $\pm$ 17.0 ^{Bb}	684.7 $\pm$ 19.9 ^{Ab}	629.5 $\pm$ 12.2 ^{Cb}	650.9 $\pm$ 5.7 ^{ACc}	582.9 $\pm$ 6.6 ^{Dc}
	RoT	613.8 $\pm$ 6.3 ^{ACb}	641.6 $\pm$ 23.5 ^{Bb}	659.7 $\pm$ 11.4 ^{Ab}	613.3 $\pm$ 22.2 ^{Bc}	577.3 $\pm$ 16.5 ^{Cc}
Delphinidin-3- <i>O</i> -glucoside (mg/100 g)						
JM	RefT	137.8 $\pm$ 3.8 ^{ABa}	149.2 $\pm$ 7.5 ^{Aa}	117.1 $\pm$ 1.2 ^{Cb}	109.8 $\pm$ 4.5 ^{Ca}	131.2 $\pm$ 4.9 ^{Ba}
	RoT	131.0 $\pm$ 1.7 ^{Bb}	124.6 $\pm$ 2.7 ^{BCb}	149.5 $\pm$ 4.2 ^{Aa}	111.9 $\pm$ 2.1 ^{Da}	119.0 $\pm$ 0.3 ^{Cb}
JFM	RefT	78.1 $\pm$ 2.1 ^{Bc}	83.9 $\pm$ 2.6 ^{Ac}	58.8 $\pm$ 2.3 ^{Dd}	60.0 $\pm$ 1.0 ^{CDc}	64.4 $\pm$ 0.8 ^{Cc}
	RoT	71.2 $\pm$ 0.6 ^{Bd}	78.4 $\pm$ 2.5 ^{Ac}	76.5 $\pm$ 1.0 ^{Ac}	68.1 $\pm$ 3.3 ^{Cb}	66.5 $\pm$ 1.3 ^{Bc}
Ellagic acid (mg/100 g)						
JM	RefT	108.4 $\pm$ 5.3 ^{Ca}	110.6 $\pm$ 4.7 ^{Bb}	99.1 $\pm$ 2.7 ^{Cb}	101.3 $\pm$ 1.7 ^{BCb}	134.0 $\pm$ 1.6 ^{Ab}
	RoT	102.6 $\pm$ 0.6 ^{Da}	134.1 $\pm$ 1.3 ^{Ca}	130.1 $\pm$ 4.1 ^{Ba}	138.5 $\pm$ 5.4 ^{ABa}	146.5 $\pm$ 3.6 ^{Aa}
JFM	RefT	53.3 $\pm$ 1.9 ^{Cb}	58.5 $\pm$ 1.1 ^{Bc}	49.3 $\pm$ 0.2 ^{Dd}	51.2 $\pm$ 0.3 ^{CDd}	63.5 $\pm$ 0.9 ^{Ac}
	RoT	51.0 $\pm$ 0.6 ^{Db}	57.0 $\pm$ 1.7 ^{Cc}	63.8 $\pm$ 0.7 ^{Ac}	61.7 $\pm$ 0.0 ^{Abc}	58.8 $\pm$ 2.0 ^{BCc}
Gallic acid (mg/100 g)						
JM	RefT	73.9 $\pm$ 0.2 ^{Ba}	52.3 $\pm$ 0.0 ^{Ca}	21.2 $\pm$ 0.4 ^{Dc}	27.5 $\pm$ 0.4 ^{Bc}	83.5 $\pm$ 1.5 ^{Ab}
	RoT	72.6 $\pm$ 3.7 ^{Ca}	50.1 $\pm$ 0.9 ^{Eb}	59.8 $\pm$ 1.0 ^{Da}	84.7 $\pm$ 1.2 ^{Ba}	119.1 $\pm$ 1.1 ^{Aa}
JFM	RefT	23.8 $\pm$ 0.2 ^{Bb}	18.4 $\pm$ 0.8 ^{Cc}	9.9 $\pm$ 0.1 ^{Ed}	13.8 $\pm$ 0.1 ^{Db}	48.6 $\pm$ 0.2 ^{Ac}
	RoT	22.0 $\pm$ 0.9 ^{Db}	7.3 $\pm$ 0.0 ^{Ad}	27.3 $\pm$ 0.2 ^{Bb}	26.8 $\pm$ 1.4 ^{BCb}	24.8 $\pm$ 0.4 ^{Cd}
Total soluble + insoluble phenolics compounds (mg/100 g)						
JM	RefT	3.557,4 $\pm$ 165.2 ^{Aa}	3.639,4 $\pm$ 175.3 ^{Aa}	2.812,3 $\pm$ 85.6 ^{Cb}	2.783,7 $\pm$ 7.3 ^{Cb}	3.564,4 $\pm$ 171.0 ^{Bb}
	RoT	3.030,7 $\pm$ 124.2 ^{Cb}	3.064,7 $\pm$ 56.6 ^{Cb}	4.052,2 $\pm$ 82.9 ^{Aa}	3.434,1 $\pm$ 127.1 ^{Ba}	4.165,2 $\pm$ 11.3 ^{Aa}
JFM	RefT	1.296,8 $\pm$ 25.7 ^{Dc}	1.768,0 $\pm$ 53.3 ^{Ac}	1.282,4 $\pm$ 16.1 ^{Cd}	1.338,8 $\pm$ 45.9 ^{Cd}	1.458,5 $\pm$ 8.1 ^{Bd}
	RoT	1.518,2 $\pm$ 31.7 ^{Dc}	1.915,6 $\pm$ 98.3 ^{Bc}	1.672,1 $\pm$ 15.6 ^{Cc}	1.648,9 $\pm$ 22.7 ^{CDc}	2.507,8 $\pm$ 49.1 ^{Ac}

JM: *L. fermentum* mix + freeze-dried jabuticaba peel; JFM: *L. fermentum* mix + freeze-dried jabuticaba peel + fructooligosaccharides

Note: A–E: Different superscript capital letters in the same row differ ($p \leq 0.05$), based on Tukey's test; a–d: different superscript small letters in the same column for the same phenolic compound differ ($p \leq 0.05$), based on Tukey's test

($p > 0.05$). JM had a higher content of delphinidin-3-*O*-glucoside (131.2 ± 4.9 and 119.0 ± 0.3 mg/100 g, respectively) than JFM (64.4 ± 0.8 and 66.5 ± 1.3 mg/100 g, respectively) on day 90 of refrigerated and room temperature storage ($p \leq 0.05$).

JM had overall higher contents of ellagic acid than JFM during refrigerated (108.4 ± 5.3 to 134.0 ± 1.6 mg/100 g and 53.3 ± 1.9 to 63.5 ± 0.9 mg/100 g, respectively) and room temperature storage (73.9 ± 0.2 to 83.5 ± 1.5 mg/100 g and 23.8 ± 0.2 to 48.6 ± 0.2 mg/100 g, respectively) ($p \leq 0.05$). Similarly, JFM had overall higher contents of gallic acid than JM during refrigeration (73.9 ± 0.2 to 83.5 ± 1.5 mg/100 g and 23.8 ± 0.2 to 48.6 ± 0.2 mg/100 g, respectively) and room temperature storage (73.9 ± 0.2 to 83.5 ± 1.5 mg/100 g and 22.0 ± 0.9 to 24.8 ± 0.4 mg/100 g, respectively) ($p \leq 0.05$). The contents of ellagic and gallic acids increased overall in JM and JFM during refrigerated and room temperature storage ($p \leq 0.05$).

Antioxidant activity of the nutraceuticals during storage

Table 4 shows the antioxidant activity of JM and JFM measured with ABTS•+, DPPH•, and FRAP methods during refrigerated and room temperature storage (11% RH). JM and JFM showed antioxidant activity during the 90 days of refrigerated and room temperature storage when measured with ABTS•+, DPPH•, and FRAP methods. However, the antioxidant activity of JM and JFM reduced overall on day 90 regardless of the storage temperature compared to day zero ($p \leq 0.05$). The antioxidant activity of JM and JFM did not differ until day 60 of refrigerated and room temperature storage ($p > 0.05$). JFM had higher antioxidant activity than JM over time regardless of the storage temperature and the method used to measure it ($p \leq 0.05$). The DPPH method detected the highest antioxidant activity of JM and JFM during refrigerated and room temperature storage, while the FRAP method detected the lowest antioxidant activity.

Table 4 Antioxidant activity (average $\pm$ standard deviation, $n = 3$) of JM and JFM on days zero, 15, 30, 60, and 90 of refrigerated and room temperature storage [RefT (4 ± 0.5 °C) and RoT (25 ± 0.5 °C)]

Storage condition/nutraceutical		Storage time				
		Day zero	Day 15	Day 30	Day 60	Day 90
ABTS ^{•+} ($\mu\text{mol Trolox/g}$)						
JM	RefT	$8.38 \pm 0.14^{\text{Ab}}$	$8.03 \pm 0.09^{\text{Abc}}$	$5.56 \pm 0.07^{\text{Bc}}$	$5.16 \pm 0.23^{\text{Cb}}$	$4.32 \pm 0.20^{\text{Db}}$
	RoT	$8.87 \pm 0.17^{\text{Ab}}$	$7.74 \pm 1.20^{\text{ABc}}$	$6.93 \pm 2.82^{\text{Bbc}}$	$6.66 \pm 0.44^{\text{Ba}}$	$6.42 \pm 0.41^{\text{Ba}}$
JFM	RefT	$9.48 \pm 0.13^{\text{Aa}}$	$9.36 \pm 0.15^{\text{Aab}}$	$8.88 \pm 0.11^{\text{Ba}}$	$5.38 \pm 0.18^{\text{Cb}}$	$4.33 \pm 0.20^{\text{Db}}$
	RoT	$9.67 \pm 0.20^{\text{Aa}}$	$9.47 \pm 0.16^{\text{Aa}}$	$7.84 \pm 0.82^{\text{Bab}}$	$7.56 \pm 0.76^{\text{Ba}}$	$7.02 \pm 0.28^{\text{Ba}}$
DPPH [•] ($\mu\text{mol Trolox/g}$)						
JM	RefT	$9.10 \pm 0.13^{\text{Ab}}$	$8.94 \pm 0.18^{\text{Aa}}$	$8.74 \pm 0.18^{\text{ABa}}$	$8.43 \pm 0.16^{\text{Bab}}$	$8.00 \pm 0.12^{\text{Ca}}$
	RoT	$9.20 \pm 0.24^{\text{Aab}}$	$8.76 \pm 0.22^{\text{ABa}}$	$8.67 \pm 0.25^{\text{ABa}}$	$8.33 \pm 0.30^{\text{BCb}}$	$7.84 \pm 0.31^{\text{Cb}}$
JFM	RefT	$9.62 \pm 0.28^{\text{Aab}}$	$9.41 \pm 0.31^{\text{ABa}}$	$9.16 \pm 0.42^{\text{ABa}}$	$8.92 \pm 0.24^{\text{Bab}}$	$8.48 \pm 0.55^{\text{Ba}}$
	RoT	$9.78 \pm 0.22^{\text{Aa}}$	$9.41 \pm 0.40^{\text{ABa}}$	$9.26 \pm 0.44^{\text{ABa}}$	$9.04 \pm 0.32^{\text{ABa}}$	$8.56 \pm 0.34^{\text{Ba}}$
FRAP ($\mu\text{mol FeSO}_4/\text{g}$)						
JM	RefT	$3.85 \pm 0.11^{\text{Ac}}$	$3.61 \pm 0.19^{\text{ABb}}$	$3.46 \pm 0.20^{\text{ABCc}}$	$3.38 \pm 0.16^{\text{BCc}}$	$3.15 \pm 0.12^{\text{Cb}}$
	RoT	$4.37 \pm 0.38^{\text{Abc}}$	$4.21 \pm 0.29^{\text{Aab}}$	$4.09 \pm 0.19^{\text{Abc}}$	$4.02 \pm 0.12^{\text{Ab}}$	$3.86 \pm 0.10^{\text{Aa}}$
JFM	RefT	$4.90 \pm 0.16^{\text{Ab}}$	$4.60 \pm 0.34^{\text{ABa}}$	$4.42 \pm 0.29^{\text{ABab}}$	$4.12 \pm 0.26^{\text{Bbab}}$	$4.06 \pm 0.28^{\text{Ba}}$
	RoT	$5.52 \pm 0.14^{\text{Aa}}$	$4.80 \pm 0.12^{\text{Ba}}$	$4.68 \pm 0.20^{\text{Ba}}$	$4.53 \pm 0.12^{\text{BCa}}$	$4.24 \pm 0.15^{\text{Ca}}$

JM: *L. fermentum* mix + freeze-dried jabuticaba peel; JFM: *L. fermentum* mix + freeze-dried jabuticaba peel + fructooligosaccharides

Note: A–D: Different superscript capital letters in the same row differ ($p \leq 0.05$), based on Tukey's test; a–d: different superscript small letters in the same column for the same method to measure the antioxidant activity differ ($p \leq 0.05$), based on Tukey's test. Abbreviations: ABTS^{•+} cation—2,2-azino-bis (3-ethylbenzo-tiazoline)-6-sulfonic acid; DPPH[•], 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl; FRAP, ferric-reducing ability of plasma; FeSO₄, ferrous sulfate

Chemometric analysis

The PCA results located JM on days zero and 15 of storage, as well as JFM on days zero, 15, and 30 of storage in the upper quadrants with the highest viable cell counts and the highest sizes of live cell subpopulations of *L. fermentum*, as well as the greatest antioxidant activity (DPPH, ABTS, and FRAP methods) (Fig. 4A). JFM on day 60 of storage was in the lower quadrant, with the highest sizes of *L. fermentum* injured cell subpopulation, and JM on day 90 of storage was in the lowest and most distant quadrant for all parameters, indicating the worst results. The Pearson correlation results showed that the viable cell counts of *L. fermentum* positively correlated with antioxidant activity (DPPH, ABTS, and FRAP methods) and live cell population size in JM and JFM, while the viable cell counts of *L. fermentum* negatively correlated with antioxidant activity and injured cell population size (Fig. 4B).

Discussion

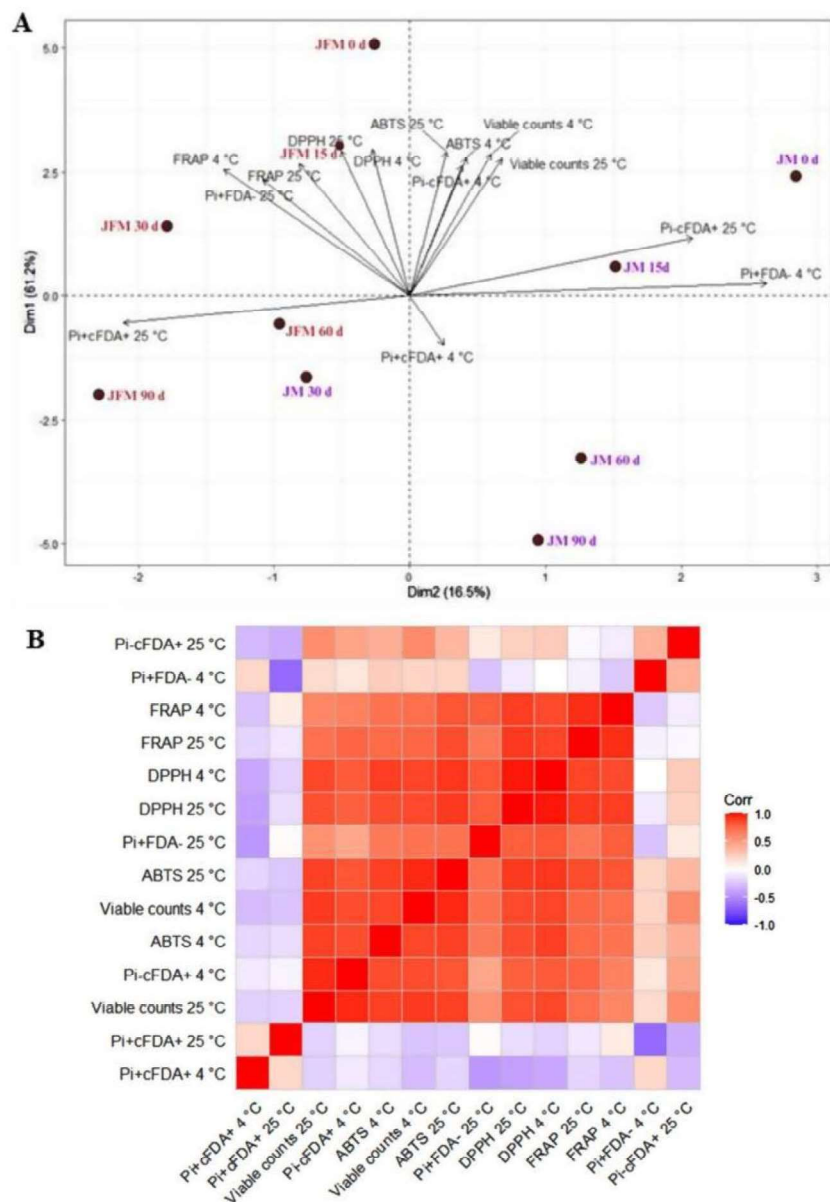
JM and JFM had a mass loss below 120 °C, probably associated with water release [36]. JM and JFM stored under refrigeration had endothermic peaks and mass losses at higher temperatures than when stored under room temperature. Still, the presence of FOS in JFM could be linked to detecting endothermic peaks at a higher temperature

compared to JM. The presence of FOS likely increased the glass transition temperature (T_g) of JFM by binding to other compounds, delaying the transition to the rubbery state and maintaining the glassy state. This, in turn, could help protect powdered components from detrimental changes, such as oxidation [37].

The endothermic peak of JM and JFM at 118 °C may be attributed to structural changes in anthocyanins, which typically undergo phase transitions between 120 and 140 °C [38], potentially involving the cleavage of glycosidic bonds to form aglycone derivatives [39]. The weight loss observed at 150 °C could be associated with the evaporation of moisture, low molecular weight compounds, and volatile substances [40]. At the same time, temperature above 200 °C could cause weight loss related to FOS thermal degradation [29]. Temperatures ranging from 180 to 270 °C cause weight loss due to hemicelluloses decomposition, and temperatures until 400 °C cause weight loss due to celluloses decomposition. JM and JFM had endothermic peaks above 600 °C, probably due to the decomposition of aromatic structures [41, 42].

JFM stored under refrigeration exhibited excellent thermal stability, likely maintaining its glass transition temperature (T_g) above 130 °C. The amorphous (or vitrified) state is ideal for preserving the stability of probiotics and other bioactive compounds in powdered nutraceuticals during storage. When probiotics transition to the rubbery state, they risk inactivation, underscoring the importance of

Fig. 4 (A) Principal Component Analysis (PCA) run for results (variables: *L. fermentum* viable cell count, *L. fermentum* cell physiological status, and antioxidant activity) of JM and JFM at 11% relative humidity on days zero, 15, 30, 60, and 90 of refrigerated and room temperature storage [RefT (4 ± 0.5 °C) and RoT (25 ± 0.5 °C)]. (B) Correlation coefficients indicate the associations between viable cell count, cellular physiological status, and antioxidant activity



maintaining a stable amorphous state for optimal probiotic viability and functionality [43].

Nutraceuticals are dietary alternatives for improving the bioavailability, solubility, and stability of food-grade bioactive components [44]; however, it is necessary to control some factors (e.g., a_w , solubility, and hygroscopicity) affecting the stability of powdered nutraceuticals during storage [45, 46]. JM and JFM had low a_w (< 0.3), favoring their stability during storage with controlled humidity. A powdered

product with a low a_w (< 0.6) is typically considered stable because it hinders physicochemical degradation reactions and microbial metabolic activities [45], besides increasing the stability of phenolic compounds [47]. Furthermore, a_w between 0.2 and 0.3 could favor bacterial cell viability due to the interaction of water with functional groups, preventing interactions of bacterial cell membrane constituents with oxygen that induce oxidation and cellular damage [48].

Solubility is a crucial factor in determining the use of bioactive compounds in nutraceutical production, as it typically enhances bioavailability [49]. During the 90 days of storage, JFM showed higher solubility than previously reported for citric acid, alginate, and maltodextrin [50], common ingredients used to improve the solubility of bioactive compounds in nutraceuticals [51, 52].

Humidity control during storage is essential for maintaining low hygroscopicity and stability of powdered nutraceuticals. Hygroscopicity is identified as one of the main problems in keeping the stability of powders containing FOS, a compound with high hygroscopicity [53, 54]. High hygroscopicity induces physicochemical alterations affecting stability during storage, besides accelerating chemical and microbial degradation, which is a challenge for using phenolic compounds to develop nutraceuticals and other functionalized products [55]. JFM had a higher hygroscopicity than JM, possibly due to the presence of FOS in the former composition.

The ultrastructural aspects of JM and JFM stored under refrigeration showed the predominance of more visible elongated structures, indicating the presence of entrapped *L. fermentum* cells in their structure. JFM stored under room temperature showed a spongier structure. In contrast, JFM stored under refrigerated temperature showed a predominantly smoother surface, indicating that *L. fermentum* cells were incorporated into its structure [28]. The survival of probiotic cells is crucial to nutraceutical functionality [38]. JFM maintained the highest survival rates of *L. fermentum* during refrigerated storage, highlighting its potential and greater stability since this species commonly shows excellent survival during refrigerated storage. However, the survival of *L. fermentum* is influenced by environmental conditions, such as temperature and pH. Higher temperatures could facilitate water absorption and increase oxidative effects in freeze-dried cultures, detrimental to bacteria survival [56–58].

The high contents of phenolic compounds and dietary fiber, particularly soluble fiber [17], in freeze-dried jabuticaba peel may have protected *L. fermentum* cells during freeze-drying and long-term storage under refrigerated and room temperatures. These protective effects were more pronounced in JFM than in JM, likely due to the inclusion of FOS in the JFM formulation. FOS present in the nutraceutical serves as a carbon source for probiotic strains, supporting their survival and cellular activity during storage [57]. An early study showed that using FOS as a coating material effectively protected probiotic *Lactiplantibacillus plantarum* during freeze-drying and storage in a symbiotic lychee juice [59].

Evidence in the literature supports beneficial interactions between probiotics and phenolic compounds, which

can enhance the stability of nutraceuticals and protect probiotic cells as they transit through the gastrointestinal tract to colonize the human intestine [60, 61]. The physiological responses of *L. fermentum* cells showed that JM and JFM stored under refrigeration maintained a higher proportion of live cells than those stored at room temperature, aligning with plate count results. Storage duration and temperature are known to influence the viability and physiological state of probiotics [29].

The size of the live *L. fermentum* cell subpopulation in JM and JFM reduced during storage. However, these reductions were more intense from day 30 of storage onwards, in parallel with the increased size of the injured *L. fermentum* cell subpopulation. These results could indicate that *L. fermentum* cells in JM and JFM entered the viable but non-culturable (VBNC) state. This reversible physiological condition possibly occurs when bacterial cells are exposed to various stresses [62]. Although they can still exert health benefits, they need effective methods to attest to their condition [32, 62, 63]. Flow cytometry allows the identification of the physiological state of the microorganisms under examination. The results indicate that vitality was maintained despite a significant reduction in the viable cell count. However, the viable cell plate count and flow cytometry results suggest that refrigeration is a more favorable condition for maintaining cell vitality. Higher temperatures could facilitate water absorption and increase oxidative effects in freeze-dried cultures, which are detrimental to bacteria survival [28].

Anthocyanins and phenolic acids, especially ellagic and gallic acids, are the main phenolic compounds in jabuticaba peel [17, 35, 64]. The contents of anthocyanins in JM and JFM reduced during storage, while the contents of gallic and ellagic acids increased regardless of the storage temperature. Anthocyanin levels were higher in JM and JFM stored under refrigeration rather than when stored under room temperature, indicating enhanced stability at lower temperatures. Anthocyanins are compounds sensitive to environmental conditions, especially high temperatures. Their stability can be altered during processing and storage, triggering an oxidative process, degradation, and reduction of antioxidant activity [65]. The hydrolysis of some phenolic compounds naturally occurring in JFP could be associated with the increase in the contents of ellagic and gallic acids in JM and JFM [17]. Still, the depolymerization of ellagitannins and gallotannins could increase the contents of gallic and ellagic acids in JM and JFM during storage [8]. The depolymerization changes the chemical structure of some phenolic compounds, which could increase the contents of ellagic and gallic acids and antioxidant activity [66], besides making ellagic and gallic acids more bioavailable to exert beneficial effects on human health [5]. Additionally,

the simultaneous consumption of phenolic compounds and probiotics could increase bioactivity due to the action of intestinal microorganisms to produce derived metabolites with high antioxidant activity and activate probiotic metabolism in the colonic environment [17, 67].

JM and JFM showed antioxidant activity during the 90 days of refrigerated and room temperature storage, although this bioactivity had reduced over time. The presence of phenolic compounds naturally occurring in jaboticaba peel and the reported antioxidant properties of the tested *L. fermentum* strains could provide the antioxidant activity of JM and JFM during storage. The antioxidant properties of anthocyanins are crucial to their health-promoting effects, with the potential to minimize or prevent oxidative damage, thereby enhancing the storage stability of formulated products [18, 68, 69].

PCA results showed that JM and JFM had overall the best performance until 30 days of storage regarding the measured parameters, confirming the beneficial interaction between the phenolic compounds present in jaboticaba peel and *L. fermentum* strains, allowing to maintain the stability of these nutraceuticals during storage. The Pearson correlation results showed that the viable cell counts of *L. fermentum* positively correlated with the live cell subpopulation and the antioxidant activity. This relationship reinforces the efficacy of phenolic compounds in preserving high viable cell counts of lactobacilli and promoting antioxidant activity in freeze-dried matrices [18, 23, 29].

In conclusion, the examined nutraceuticals showed stability under various temperature conditions, with refrigeration being the optimal storage method. During storage, JFM stored under refrigeration showed the highest viable cell counts of *L. fermentum*, with counts above 6.6 log CFU/g for up to 90 days. Despite a decrease in cell viability over time, the physiological status of *L. fermentum* indicated that the cells retained both vitality and functionality, regardless of the storage temperature. The antioxidant properties of the phenolic compounds were preserved, and these compounds exhibited potential bioaccessibility within the nutraceutical matrix. Under the conditions tested, JFM stored under refrigeration exhibited superior stability and functional potential, maintaining high viable cell counts, phenolic content, and antioxidant activity during storage. The formulation of JFM, with FJP, a combination of potential probiotic *L. fermentum* strains (139, 263, and 296), and FOS, represents a promising approach for delivering health benefits to consumers. Overall, this study provides an initial step toward identifying an innovative nutraceutical. However, further research using in vivo models and comprehensive parameters is necessary to determine the most effective administration method.

Acknowledgements The authors thank the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES, Brazil) (Finance code 001) for funding this research.

Author contributions Conceptualization: HMAN, ELS; Data curation: HMAN, ELS; Formal analysis: HMAN, JYPS, ELS; Software: HMAN, KBS; Funding acquisition: ELS; Investigation: HMAN, JYPS, SPAO, TMRA, ESM, FSS. Methodology: HMAN, JYPS, SPAO, TMRA, MM, ESM, FSS, ELS; Project administration: HMAN, ELS; Supervision: ELS; Writing—original draft: HMAN, ELS; Writing—review & editing: HMAN, ELS. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Data availability The data will be made available upon request.

Declarations

Competing interest The authors declare no known competing financial interests or personal relationships that could have appeared to influence the work reported in this manuscript.

References

- Puri V, Nagpal M, Singh I et al (2022) A comprehensive review on nutraceuticals: therapy support and formulation challenges. *Nutrients* 14:4637. <https://doi.org/10.3390/nu14214637>
- Chiu H, Venkatakrishnan K, Wang C (2020) The role of nutraceuticals as a complementary therapy against various neurodegenerative diseases: a mini-review. *J Trad Complement Med* 10:434–439. <https://doi.org/10.1016/j.jtcm.2020.03.008>
- Joshi T, Deepa P, Sharma PK (2022) Effect of different proportions of phenolics on antioxidant potential: pointers for bioactive synergy/antagonism in foods and nutraceuticals. *Proc Nat Acad Sci* 92:939–946. <https://doi.org/10.1007/s40011-022-01396-6>
- Medeiros GKVV, Martins ACS, Vasconcelos MG et al (2024) *Cereus jamacaru* DC. (mandacaru) fruit as a source of lactic acid bacteria with in vitro probiotic-related characteristics and its protective effects on *Pediococcus pentosaceus* during lyophilization and refrigeration storage. *Int J Food Microbiol* 417:110695. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2024.110695>
- Faller ALK, Duarte PA, Paes JM et al (2023) Jaboticaba (*Myrciaria jaboticaba*) peel and seed powder associated with bioprocessing improves functional and nutritional quality of whole-wheat bread. *Intern J Food Tech* 58:1411–1422. <https://doi.org/10.1111/ijfs.16303>
- dos Santos AS, de Albuquerque TMR, de Brito Alves JL, de Souza EL (2019) Effects of quercetin and resveratrol on in vitro properties related to the functionality of potentially probiotic *Lactobacillus* strains. *Front Microbiol* 10:2229. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.02229>
- Fernandes IAA, Maciel GM, Maroldi WV et al (2022) Bioactive compounds, health-promotion properties and technological applications of jaboticaba: a literature overview. *Measur: Food* 8:100057. <https://doi.org/10.1016/j.measfoo.2022.100057>
- Inada KOP, Nunes S, Martínez-Blázquez JA et al (2020) Effect of high hydrostatic pressure and drying methods on phenolic compounds profile of jaboticaba (*Myrciaria jaboticaba*) peel and seed. *Food Chem* 309:125794. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2019.125794>
- dos Santos MCP, Cavalcanti EAC, Santos MCB et al (2022) Profile of phenolic compounds in jaboticaba (*Myrciaria* sp.) a potential functional ingredient. *Nat Lib Med* 36:3717–3720. <https://doi.org/10.1080/14786419.2020.1868459>

10. Cavalcante RG, Albuquerque TM, Luna-Freire MO et al (2019) The probiotic *Lactobacillus fermentum* 296 attenuates cardiometabolic disorders in high fat diet-treated rats. *Nutrit Metab Cardiovas Dis* 29:1408–1417. <https://doi.org/10.1016/j.numecd.2019.08.003>
11. Ferreira GAH, Magnani M, Cabral L et al (2022) Potentially probiotic *limosilactobacillus fermentum* fruit-derived strains alleviate cardiometabolic disorders and gut microbiota impairment in male rats fed a high-fat diet. *Probiotics Antimicrob Proteins* 14:349–359. <https://doi.org/10.1007/s12602-021-09889-y>
12. de Luna Freire MOL, do Nascimento LCP, de Oliveira KAR et al (2021) *Limosilactobacillus fermentum* strains with claimed probiotic properties exert anti-oxidant and antiinflammatory properties and prevent cardiometabolic disorder in female rats fed a high-fat diet. *Probiotics Antimicrob Proteins* 15:601–613. <https://doi.org/10.1007/s12602-021-09878-1>
13. Cruz Neto JPR, Oliveira AM, de Oliveira KAR (2023) Safety evaluation of a novel potentially probiotic *limosilactobacillus fermentum* in rats. *Probiotics Antimicrob Proteins* 16:752–762. <https://doi.org/10.1007/s12602-023-10077-3>
14. Trindade PL, Soares ER, Inada KOP et al (2022) Consumption of phenolic-rich jabuticaba (*Myrciaria jaboticaba*) powder ameliorates obesity-related disorders in mice. *Br J Nutr* 127:344–352. <https://doi.org/10.1017/s0007114521001136>
15. Lima R, Silva MVT, Gomes BA et al (2023) Chemical profile and hematoprotective activity of artisanal jabuticaba (*Plinia jabuticaba*) wine and derived extracts. *Fermentation* 9:157. <https://doi.org/10.3390/fermentation9020157>
16. Gasparotto A Junior, de Souza P, Livero FA, Livero FAR (2019) *Plinia cauliflora* (Mart.) Kausel: a comprehensive ethnopharmacological review of a genuinely Brazilian species. *J Ethnopharm* 5(112169). <https://doi.org/10.1016/j.jep.2019.112169>
17. da Silva JYP, Nascimento HMA, Albuquerque TMR et al (2023) Revealing the potential impacts of nutraceuticals formulated with freeze-dried jabuticaba peel and *limosilactobacillus fermentum* strains candidates for probiotic use on human intestinal microbiota. *Probiotics Antimicrob Proteins* 16:1773–1789. <https://doi.org/10.1007/s12602-023-10134-x>
18. do Nascimento LCP, Lacerda DC, Ferreira DJS et al (2022) *LimosilactobacFermentummentum*, current evidence on the anti-oxidant properties and opportunities to be exploited as a probiotic microorganism. *Probiotics Antimicrob Proteins* 14:960–979. <https://doi.org/10.1007/s12602-022-09943-3>
19. Santos LAC, Carvalho RDO, Cruz Neto JPR et al (2024) A mix of potentially probiotic *limosilactobacillus fermentum* strains alters the gut microbiota in a dose- and sex-dependent manner in Wistar rats. *Microorganisms* 12:659. <https://doi.org/10.3390/microorgan12040659>
20. Nascimento LCP, de Souza EL, Freire MOL et al (2022) *LimosilactobacFermentummentum* prevents gut-kidney oxidative damage and the rise in blood pressure in male rat offspring exposed to a maternal high-fat diet. *J Develop Orig Health Disease* 13:719–726. <https://doi.org/10.1017/s2040174422000198>
21. McClements DJ (2020) Advances in nanoparticle and microparticle delivery systems for increasing the dispersibility, stability, and bioactivity of phytochemicals. *Biotech Adv* 38:107287. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2018.08.004>
22. Zhang S, Li X, Ai B et al (2022) Binding of β -lactoglobulin to three phenolics improves the stability of phenolics studied by multispectral analysis and molecular modeling. *Food Chem X* 15:100369. <https://doi.org/10.1016/j.fochx.2022.100369>
23. Freire MOL, do Nascimento LCP, de Oliveira KAR et al (2021) Effects of a mixed *limosilactobacillus fermentum* formulation with claimed probiotic properties on cardiometabolic variables, biomarkers of inflammation and oxidative stress in male rats fed a high-fat diet. *Foods* 10:2202. <https://doi.org/10.3390/foods10092202>
24. Oliveira Y, Cavalcanti RGS, Cavalcanti Neto MP et al (2020) Oral administration of *Lactobacillus fermentum* post-weaning improves the lipid profile and autonomic dysfunction in rat offspring exposed to maternal dyslipidemia. *Food Func* 11:5581–5594. <https://doi.org/10.1039/d0fo00514b>
25. Garcia EF, Luciano WA, Xavier DE et al (2016) Identification of lactic acid bacteria in fruit pulp processing byproducts and potential probiotic properties of selected lactobacillus strains. *Front Microbiol* 30:1371. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.01371>
26. Yang L, Ling W, Du Z et al (2017) Effects of anthocyanins on cardiometabolic health: a systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials. *Advan Nutr* 8:684–693. <https://doi.org/10.3945/an.116.014852>
27. Zhao Y, Xu H, Tian Z et al (2021) Dose-dependent reductions in plasma ceramides after anthocyanin supplementation are associated with improvements in plasma lipids and cholesterol efflux capacity in dyslipidemia: a randomized controlled trial. *Clin Nutr* 40:1871–1878. <https://doi.org/10.1016/j.clnu.2020.10.014>
28. Sampaio KB, Nascimento YM, Tavares JF et al (2021) Development and in vitro evaluation of novel nutraceutical formulations composed of *limosilactobacillus fermentum*, quercetin and/or resveratrol. *Food Chem* 16:128264. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2020.128264>
29. Nascimento DS, Sampaio KB, Nascimento YM et al (2022) Evaluating the stability of a novel nutraceutical formulation combining probiotic *limosilactobacillus fermentum* 296, quercetin, and resveratrol under different storage conditions. *Probiotics Antimicrob Proteins* 16:13–25. <https://doi.org/10.1007/s12602-022-10011-z>
30. Cano-Chauca M, Stringheta PC, Ramos AM, Cal-Vidal J (2005) Effect of the carriers on the microstructure of mango powder obtained by spray drying and its functional characterization. *Innov Food Sci Emerg Techn* 6:420–428. <https://doi.org/10.1016/j.ifset.2005.05.003>
31. Cai YZ, Corke H (2000) Production and properties of spray dried amaranthus betacyanin pigments. *J Food Sci* 65:1248–1252. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.2000.tb10273.x>
32. Rodrigues NPA, Garcia EF, de Souza EL (2021) Selection of lactic acid bacteria with promising probiotic aptitudes from fruit and ability to survive in different food matrices. *Braz J Microbiol* 52:2257–2269. <https://doi.org/10.1007/s42770-021-00543-x>
33. Paparella A, Taccogna L, Aguzzi I et al (2008) Flow cytometric assessment of the antimicrobial activity of essential oils against *Listeria monocytogenes*. *Food Cont* 19:1174–1182. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2008.01.002>
34. Pedrosa GTS, Souza EL, Melo ANF et al (2020) Physiological alterations involved in inactivation of autochthonous spoilage bacteria in orange juice caused by *Citrus* essential oils and mild heat. *Intern J Food Microbiol* 334:108837. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2020.108837>
35. Massa NML, Oliveira SPA, Rodrigues NPA et al (2022) In vitro colonic fermentation and potential prebiotic properties of pre-digested jabuticaba (*Myrciaria jaboticaba* (Vell.) Berg) by-products. *Food Chem* 388:133003. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2022.133003>
36. Bai X, Li C, Yu L et al (2019) Development and characterization of soybean oil microcapsules employing kafirin and sodium caseinate as wall materials. *LWT- Food Sci Technol* 111:235–241. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2019.05.032>
37. Tatasciore S, Santarelli V, Neri L et al (2023) Freeze-drying microencapsulation of hop extract: Effect of carrier composition on physical, techno-functional, and stability properties. *Antioxidants* 12:442. <https://www.mdpi.com/journal/antioxidants>

38. Li H, Guo X, Zhu X et al (2023) Effect of *pholiota nameko* polysaccharides on lactic acid bacteria viability, physicochemical properties, sensory properties and free radicals scavenging activities of fermented soymilk. *J Food Measur Characteriz* 17:4415–4433. <https://doi.org/10.1007/s11694-023-01967-9>
39. Modesto Junior FN, Martins MG, Pereira GA et al (2023) Stability kinetics of anthocyanins of grumixama berries (*Eugenia brasiliensis* Lam.) During thermal and light treatments. *Foods* 12:565. <https://doi.org/10.3390/foods12030565>
40. Kumar DK, Loskot J, Kriz J et al (2020) Synthesis of SnSe quantum dots by successive ionic layer adsorption and 76 reaction (SILAR) method for efficient solar cells applications. *Sol Energy* 199:570–574. <https://doi.org/10.1016/j.solener.2020.02.050>
41. González-García P (2018) Activated carbon from lignocellulosic precursors: a review of the synthesis methods, characterization techniques and applications. *Renew Sustain Energy Reviews* 82:1393–1414. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2017.04.117>
42. Romano N, Schebor C, Mobili P et al (2016) Role of mono- and oligosaccharides from FOS as stabilizing agents during freeze-drying and storage of *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*. *Food Res Int* 90:251–258. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2016.11.003>
43. Leyva-Porras C, Saavedra-Leos Z, Román-Aguirre M et al (2023) An equilibrium state diagram for storage stability and conservation of active ingredients in a functional food based on polysaccharides blends. *Polymers* 15:367. <https://doi.org/10.3390/polym15020367>
44. Puttasiddaiah R, Lakshminarayana R, Somashekar NL et al (2022) Advances in nanofabrication technology for nutraceuticals: new insights and future trends. *Bioengineering* 9:478. <https://doi.org/10.3390/bioengineering9090478>
45. Aguilar-Toala JE, Quintanar-Guerrero D, Liceaga AM, Zambrano-Zaragoza ML (2022) Encapsulation of bioactive peptides: a strategy to improve the stability, protect the nutraceutical bioactivity and support their food applications. *Royal Soc Chem* 12:6449–6458. <https://doi.org/10.1039/D1RA08590E>
46. Tihăuan BM, Axinie M, Marină IC et al (2022) Evaluation of the putative duplicity effect of novel nutraceuticals using physicochemical and biological in vitro models. *Foods* 11:1636. <https://doi.org/10.3390/foods11111636>
47. Baeza R, Sánchez V, Salierno G et al (2020) Storage stability of anthocyanins in freeze-dried elderberry pulp using low proportions of encapsulating agents. *Food Sci Technol* 27:135–144. <https://doi.org/10.1177/1082013220937867>
48. Murua-Pagola B, Abadía-García L, Vázquez-Aguilar MI et al (2024) The effect of incorporating microencapsulated *Lactobacillus casei* ATCC 334 on the physicochemical and rheological properties of fortified greek-style yoghurt. *Int J Dairy Technol* 77:477–486. <https://doi.org/10.1111/1471-0307.13047>
49. Azad MOK, Kang WS, Lim JD, Park CH (2019) Bio-fortification of *Angelica Gigas* Nakai nano-powder using bio-polymer by hot melt extrusion to enhance the bioaccessibility and functionality of nutraceutical compounds. *Pharmaceuticals* 13:3. <https://doi.org/10.3390/ph13010003>
50. Go E, Ryu B, Ryu S et al (2021) An enhanced water solubility and stability of anthocyanins in mulberry processed with hot melt extrusion. *Intern J Mol Sci* 22:12377. <https://doi.org/10.3390/ijms222212377>
51. Kobo GK, Kaseke T, Fawole OA (2022) Micro-encapsulation of phytochemicals in passion fruit peel waste generated on an organic farm: Effect of carriers on the quality of encapsulated powders and potential for value-addition. *Antioxidants* 11:1579. <https://doi.org/10.3390/antiox11081579>
52. Yeasmen N, Orsat V (2024) Microencapsulation of ultrasound-assisted phenolic extracts of sugar maple leaves: characterization, in vitro gastrointestinal digestion, and storage stability. *Food Res Int* 182:114133. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2024.114133>
53. Thakur M, Nanda V (2019) Process optimization of polyphenol-rich milk powder using bee pollen based on physicochemical and functional properties. *J Food Process Engin* 42:13148. <https://doi.org/10.1111/jfpe.13148>
54. Neves MIL, Strieder MM, Prata AS et al (2021) Xylooligosaccharides as an innovative carrier matrix of spray-dried natural blue colorant. *Food Hydrocol* 121:107117. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2021.107117>
55. Sarabandi K, Jafari SM (2020) Effect of chitosan coating on the properties of nanoliposomes loaded with flaxseed-peptide fractions: stability during spray-drying. *Food Chem* 25:125951. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2019.125951>
56. Grom LC, Rocha RS, Balthazar CF et al (2020) Postprandial glycemia in healthy subjects: which probiotic dairy food is more adequate? *J Dairy Sci* 103:1110–1119. <https://doi.org/10.3168/jds.2019-17401>
57. Lillo-Pérez S, Guerra-Valle M, Orellana-Palma P, Petzold G (2021) Probiotics in fruit and vegetable matrices: opportunities for nondairy consumers. *LWT - Food Sci Technol* 151:112106. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2021.112106>
58. Liao N, Luo B, Gao J et al (2019) Oligosaccharides as co-encapsulating agents: effect on oral *Lactobacillus fermentum* survival in a simulated gastrointestinal tract. *Biotechnol Lett* 41:263–272. <https://doi.org/10.1007/s10529-018-02634-6>
59. Kalita D, Saikia S, Gautam G (2018) Characteristics of synbiotic spray dried powder of litchi juice with *Lactobacillus plantarum* and different carrier materials. *LWT - Food Sci Technol* 87:351–360. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2017.08.092>
60. Ma G, Chen Y (2020) Polyphenol supplementation benefits human health via gut microbiota: a systematic review via meta-analysis. *J Func Foods* 66:103829. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2020.103829>
61. Sampaio KB, Alves JLB, Nascimento YM et al (2024) Effects of simulated gastrointestinal conditions on combined potentially probiotic *Limosilactobacillus fermentum* 296, quercetin, and/or resveratrol as bioactive components of novel nutraceuticals. *Probiotics Antimicrob Proteins* 16:308–319. <https://doi.org/10.1007/s12602-023-10046-w>
62. Cui S, Hu K, Qian Z et al (2022) Improvement of freeze-dried survival of *Lactiplantibacillus plantarum* based on cell membrane regulation. *Microorganisms* 10:1985. <https://doi.org/10.3390/microorganisms10101985>
63. Zhang X, Ahmad W, Zhu X et al (2021) Viable but nonculturable bacteria and their resuscitation: implications for cultivating uncultured marine microorganisms. *Mar Life Sci Technol* 3:189–203. <https://doi.org/10.1007/s42995-020-00041-3>
64. Paula DGCD, Vasconcelos CM, Pereira AF et al (2022) Maceration time over antioxidant activity, volatile compounds and temporal dominant sensation of fermented jabuticaba. *Food Sci Technol* 42. <https://doi.org/10.1590/fst.43221>
65. Enaru B, Dretcanu G, Pop TD et al (2021) Anthocyanins: factors affecting their stability and degradation. <https://doi.org/10.3390/antiox10121967>. *Antioxidants* 10:1967
66. Bouyahya A, El Omari N, El Hachlafi N et al (2022) Chemical compounds of berry-derived polyphenols and their effects on gut microbiota, inflammation, and cancer. *Molecules* 27:3286. <https://doi.org/10.3390/molecules27103286>
67. Almeida Neta MC, de Queiroga APR, Almeida RLJ et al (2018) Fermented dessert with whey, ingredients from the peel of jabuticaba (*Myrciaria cauliflora*) and an indigenous culture of *Lactobacillus plantarum*: composition, microbial viability, antioxidant capacity and sensory features. *Nutrients* 10:1214. <https://doi.org/10.3390/nu10091214>

68. Freire MOL, do Nascimento LCP, de Oliveira KAR (2023) *Limosilactobacillus fermentum* strains with claimed probiotic properties exert anti-oxidant and anti-inflammatory properties and prevent cardiometabolic disorder in female rats fed a high-fat diet. *Probiotics Antimicrob Proteins* 15:601–613. <https://doi.org/10.1007/s12602-021-09878-1>
69. Sampaio KB, Alves JLB, do Nascimento YM et al (2022) Nutra-ceutical formulations combining *Limosilactobacillus Fermentum*, quercetin, and or resveratrol with beneficial impacts on the abundance of intestinal bacterial populations, metabolite production, and antioxidant capacity during colonic fermentation. *Food Res Int* 161:111800. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2022.111800>

Publisher's note Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.

Springer Nature or its licensor (e.g. a society or other partner) holds exclusive rights to this article under a publishing agreement with the author(s) or other rightsholder(s); author self-archiving of the accepted manuscript version of this article is solely governed by the terms of such publishing agreement and applicable law.

APÊNDICE B – ARTIGO ORIGINAL II

----- Mensagem encaminhada -----

De: **Journal of Agricultural and Food Chemistry** <onbehalf@manuscriptcentral.com>

Data: dom., 23 de mar. de 2025 às 10:49

Assunto: Journal of Agricultural and Food Chemistry - Manuscript ID jf-2025-03603n

Para: <els@academico.ufpb.br>

Cc: <jafc@jafc.acs.org>

To improve and transform your experience of publishing with ACS journals, we are currently developing the ACS Publishing Center. As a result, you may experience interactions and communications from different systems for some elements of the process during this transition. We aim to continue providing you with the best service and appreciate your patience as we work through these changes.

23-Mar-2025

RE: Manuscript Submission Successfully Submitted

Journal: Journal of Agricultural and Food Chemistry

Manuscript ID: jf-2025-03603n

Title: "Investigating the retention of nutraceutical properties of combined jabuticaba peel and *Limosilactobacillus fermentum* during gastrointestinal digestion for long-term storage"

Authors: Nascimento, Heloisa; de Albuquerque, Tathiane; da Silva, Jaelison; de Oliveira, Sônia; da Silva, Genilton; Rodrigues, Noádia; Soares Filho, José; da Conceição, Maria; Monteiro, Mariana ; Souza, Evandro Leite de

Bioactive Constituents, Metabolites, and Functions

Manuscript Status: Submitted

Investigating the retention of the nutraceutical properties of combined jabuticaba peel and *Limosilactobacillus fermentum* during gastrointestinal digestion for long-term storage

Abstract

This study evaluated the retention of the nutraceutical properties of combined jabuticaba peel and *Limosilactobacillus fermentum* during gastrointestinal digestion for long-term storage. The bioaccessibility of phenolic compounds, antioxidant capacity, and cell viability and physiological status of *L. fermentum* in two nutraceuticals [freeze-dried jabuticaba peel (FJP) + *L. fermentum*, termed JM); FJP + *L. fermentum* + fructooligosaccharides (FOS), termed JFM] were assessed during 90 days of storage (4 ± 0.5 °C, 11% relative humidity). JFM showed the highest viable cell counts (3.76 ± 0.18 - 5.12 ± 0.12 log CFU/g) after exposure to simulated gastrointestinal digestion (SGD) during 90 days of storage. JFM presented the largest subpopulation of live cells ($29.1 \pm 0.66\%$) and the smallest subpopulation of dead cells ($5.8 \pm 0.48\%$) during SGD. The bioaccessibility of anthocyanins in JM and JFM was greater after gastric exposure, while the bioaccessibility of ellagic acid was greater after ileal exposure. The antioxidant capacity of JM and JFM was reduced during SGD and storage, likely due to the degradation of bioactive components. JM and JFM released bioaccessible phenolic compounds and metabolically active *L. fermentum* cells along the SGD. FOS could have led to JFM performing better than JM in the measured variables during long-term storage. The results evidence the efficacy of the bioactive components of JM and JFM in reaching the colonic environment, where they could interact changes in the intestinal microbiota and cause systemic beneficial health effects.

Keywords: Nutraceutical, gastrointestinal digestion, phenolic compounds, bioaccessibility, probiotic, physiological status.

26 Introduction

27 Jabuticaba [*Myrciaria cauliflora* (Mart.) O. Berg] is a native fruit of the Atlantic Forest
28 Brazilian biome. The jabuticaba fruit has a sweet, slightly acidic flavor and distinctive astringent
29 skin (1), besides being a source of various nutrients, dietary fiber, vitamins, and phenolic
30 compounds primarily concentrated in the peel (2). Despite being a valuable resource, the
31 jabuticaba fruit peel is often discarded during processing, leading to waste accumulation and
32 potential environmental impacts. However, growing interest in sustainability has highlighted its
33 potential to provide bioactive compounds, mainly phenolic compounds (3,4). In this sense,
34 research has advanced into the potential destination of jabuticaba fruit peel, corresponding to
35 around 40% of production (5).

36 The by-products generated during fruit processing are typically rich in bioactive
37 compounds, offering elevated potential for incorporation into the formulation of new foods, food
38 ingredients, and nutraceuticals, which is aligned with the growing demand for more effective and
39 sustainable alternatives in the industry (6). Transforming jabuticaba peel into nutraceuticals,
40 supplemented with potentially probiotic *Limosilactobacillus fermentum* strains, represents a
41 strategy aligned with the principles of the circular economy, aiming to reintegrate these by-
42 products and promote a more efficient and sustainable added value production chain (7).

43 Nutraceuticals emerged from the demand for products that promote improvements in
44 specific health parameters and the search for healthier eating habits (8,9). Previous studies have
45 shown that nutraceuticals are potential vehicles for ingesting phenolic compounds in jabuticaba
46 peel and *L. fermentum* cells, remaining stable for 90 days of storage (10) and promoting
47 beneficial alterations in the composition and metabolism of the human intestinal microbiota (11).
48 However, the beneficial effects of *L. fermentum* cells and phenolic compounds in these
49 nutraceuticals depend primarily on bacterial survival and viability until reaching the intestine and
50 on the bioaccessibility and bioavailability of phenolic compounds in the human body (12).

Once present in the gastrointestinal tract, *L. fermentum* cells must survive the hostile conditions of the gastric and intestinal phases that can harm cells of many bacterial species (13). Alternatives are provided for these cells to reach the colonic environment, where they could cause modulatory effects on the intestinal microbiota. The administration of nutraceuticals could allow the interaction of probiotic cells with phenolic compounds, minimizing losses during gastrointestinal digestion and better colonization in the intestine, with the production of bioaccessible metabolites and short-chain fatty acids (14-15), conferring beneficial effects on health (16).

Phenolic compounds in jabuticaba mainly include cyanidin-3-glucoside, cyanidin-3-rutinoside (anthocyanins), gallic acid, and ellagic acid (hydroxybenzoic acids) (10,11,17), with several benefits to human health (18,19). However, the functionality of phenolic compounds is limited to their bioavailability during and after gastrointestinal digestion (20,21) since their bioavailable fractions are released and stored to perform metabolic functions (18,19,22).

This study hypothesized that combining freeze-dried jabuticaba peel and potentially probiotic *L. fermentum* strains could maintain nutraceutical properties during exposure to simulated gastrointestinal conditions even after long-term storage. To test the hypothesis, the viable cell counts, bacterial cell physiological state, phenolic compound bioaccessibility, and antioxidant capacity were measured in these nutraceuticals during 90 days of storage when exposed to simulated gastrointestinal digestion (SGD).

Materials and methods

Preparation of probiotic strain inoculum

The strains of *L. fermentum* 139, *L. fermentum* 263, and *L. fermentum* 296, previously isolated from fruit processing by-products, identified with the 16S rRNA gene sequence analysis (23) and characterized as probiotic candidates in prior in vitro and in vivo studies

(11,23,24,25), were combined to formulate the nutraceuticals. These strains were maintained at -20 °C in cryovials containing de Mann, Rogosa, and Sharpe (MRS) broth (HiMedia, Mumbai, India) and glycerol (20% v/v; Sigma-Aldrich, St. Louis, MA, USA). The strains were prepared by anaerobic cultivation (37 ± 0.5 °C, 24 h; AnaeroGen, Oxoid Anaerogen Anaerobic System, Basingstoke, Hampshire, UK) in MRS broth (HiMedia), followed by centrifugation (1696×g, 10 min, 4 °C), washing (NaCl 8.5 g/L, w/v), resuspension in sterile distilled water, and equally mixed to achieve a cell suspension with approximately 11 log CFU/mL (26,27).

Preparation and storage of the nutraceuticals

Two nutraceuticals were formulated using freeze-dried jabuticaba peel (FJP) and a mixed culture suspension of the three tested *L. fermentum* strains (36 mL) in a 1:1:1 ratio. The first nutraceutical (JFM) was formulated with 13 g of FJP, the mixed *L. fermentum* culture suspension, and 20% (w/v) of fructooligosaccharides (FOS), as a cryoprotectant for bacterial cells (28). The second nutraceutical (JM) was formulated with 13 g of FJP and the mixed *L. fermentum* culture suspension without adding FOS. The content of FJP used to develop the nutraceuticals was selected considering a safe daily dose of anthocyanins for human consumption while being able to promote health benefits according to results from clinical studies, (11,29). The nutraceuticals were frozen (-80 °C, 24 h), freeze-dried (temperature -56 ± 2 °C, vacuum pressure, 30 h; Liotop, Model L-101) (30,31) and stored in sterile Petri dishes within a desiccator containing lithium chloride (LiCl) to control relative humidity (RH) for 90 days at 4 ± 0.5 °C (10). Experimental analyses were conducted at 0, 45, and 90 days of storage.

Exposure of nutraceuticals to SGD

After freeze-drying, JM and JFM were subjected to a humidification period in a desiccator containing lithium chloride (15% relative humidity) for 15 days under refrigeration

(4 ± 0.5 °C) and stored for 0, 45, and 90 days. Previously to the exposure to SGD phases, JM and JFM were rehydrated with 33 mL (1:5.5; w/v) of sterilized distilled water at 25 ± 0.5 °C. SGD was conducted sequentially, simulating the oral, gastric, and intestinal phases considering a protocol standardized in an international consensus developed by the COST Infogest network. The static process of SGD was carried out with pH adjustments and addition of specific enzymes according to each compartments as described previously (32). Enzymes and reagents were obtained from Sigma-Aldrich.

Enumeration of viable counts and measurements of the physiological status of *L. fermentum* cells exposed to SGD

Following exposure to each SGD phase, a 100 µL-aliquot of JM and JFM was serially diluted (1:9) in sterile saline solution (NaCl 8.5 g/L), plated on MRS agar (HiMedia), and anaerobically incubated (Anaerogen; 48 h, 37 ± 0.5 °C). The viable cells were counted, and the results were expressed as log CFU/mL (detection limit of 2 log CFU/mL).

Simultaneously, the staining procedure with propidium iodide (PI, Sigma-Aldrich, 10 µg/mL) and carboxyfluorescein diacetate (cFDA, Sigma-Aldrich, 2.5 µg/mL) was performed to determine the integrity of the cytoplasmic membrane and enzymatic activity of the *L. fermentum* cells present in the nutraceuticals, respectively, during exposure to each SGD phase. Cell subpopulations were determined with flow cytometry technique using a BD Accuri C6 flow cytometer (Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ, USA). Data compensation and analysis were conducted using BD Accuri C6 software (Becton Dickinson and Company) (33,34). After the cytograms were generated, three different cell subpopulations were characterized: PI-cFDA+ cells were identified as non-permeabilized with enzymatic activity (live cells); PI+cFDA+ cells were identified as permeabilized with retained enzymatic activity (damaged

cells); and PI+cFDA- cells were identified as permeabilized without enzymatic activity (dead cells) (35,36).

Determination of phenolic compounds during exposure to SGD

The contents of anthocyanins (cyanidin-3-O-glucoside and (delphinidin-3-O-glucoside) and phenolic acids (ellagic acid and gallic acid) were determined in JM and JFM before and during exposure to SGD with HPLC–DAD-MS. The liquid chromatography system (Shimadzu Corp., Kyoto, Japan) included two parallel pumps LC-20AD, automatic injector SIL-20AHT, system controller CBM-20A, degasser DGU-20A5, and diode-array detector (DAD) SPD-M20A. The results were expressed as mg/100 g (11).

Determination of the antioxidant capacity of nutraceuticals during exposure to SGD

After exposure to each SGD phase, three methods to assess antioxidant capacity of nutraceuticals were used: ABTS (2,2-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid)), DPPH (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl), and FRAP (ferric reducing antioxidant power). An aliquot (2 mL) was mixed with 70% methanol (Sigma-Aldrich) and used for antioxidant capacity determination. The DPPH free radical scavenging was determined by reading the absorbance at 517 nm (37). The ABTS•+ radical was produced from an aqueous solution of ABTS (7 mM) + potassium persulfate solution (140 mM). The mixture remained in the dark (16 h, 28 ± 0.5 °C), and was subsequently diluted in PA ethanol until reaching an absorbance of 0.7 ± 0.02 units at 734 nm (38). Antioxidant capacity determined by iron reduction (FRAP) was calculated using a ferrous sulfate curve (39).

Statistical analyses

The experiments were carried out in triplicate in three independent essays. Results were expressed as average $\pm$ standard deviation. ANOVA followed by Tukey's test determined significant differences among the results. A p -value of < 0.05 was considered statistically significant. The results were subjected to a principal component analysis (PCA) to verify the relationship between the percentage of cells in different physiological states (live, injured and dead), phenolic compound content and antioxidant capacity. Sigma Stat 3.5 (Jandel Scientific Software, San Jose, CA, USA) and R software (Version 2.15.3, Ross Ihaka and Robert Gentleman, University of Auckland, Auckland, New Zealand) were used to perform the statistical analysis.

Results

Viable cell counts of *L. fermentum* in the nutraceuticals during exposure to SGD

The viable cell counts of *L. fermentum* in JM and JFM during exposure to SGD are shown in Table 1. Before exposure to SGD (day zero), JM and JFM had viable cell counts exceeding 9 log CFU/mL, with no difference between the counts ($p \geq 0.05$). As storage time progressed, viable cell counts decreased ($p < 0.05$). At the end of storage, *L. fermentum* viable cell counts in JM and JFM were 5.80 ± 0.14 and 6.89 ± 0.22 log CFU/g, respectively. *L. fermentum* viable cell counts did not differ between the nutraceuticals over the three examined storage times ($p \geq 0.05$).

Exposure of JFM to the simulated oral phase resulted in different viable cell counts on days 45 and 90 of storage ($p < 0.05$), with counts decreasing from 7.89 ± 0.20 to 7.45 ± 0.11 log CFU/g and from 6.89 ± 0.22 to 5.74 ± 0.18 log CFU/g, respectively. Overall, JM and JFM on days 0 and 45 had viable cell counts of *L. fermentum* decreased during exposure to the different phases comprising the SGD. The most pronounced reductions ($> 1 - 2$ log CFU/g) in JM and JFM were detected after exposure to the simulated gastric digestion phase, with counts

ranging from 6.13 ± 0.09 to 4.29 ± 0.09 log CFU/g and 6.32 ± 0.22 to 5.03 ± 0.08 log CFU/g, respectively ($p < 0.05$). However, *L. fermentum* viable cell counts did not change after exposure to simulated intestinal conditions ($p \geq 0.05$). JFM had the highest *L. fermentum* viable cell counts at the end of the SGD, keeping the highest counts from the beginning (5.12 ± 0.12 log CFU/g) to the end (4.60 ± 0.3 log CFU/g) of the measured storage period ($p < 0.05$).

Physiological status of *L. fermentum* in the nutraceuticals during exposure to SGD

The physiological status of *L. fermentum* cells in JM and JFM during 90 days of storage when exposed to the different phases of the SGD is shown in Figure 1. The protocol used allowed dividing the bacterial cells into three subpopulations according to the physiological states: i) non-permeabilized cells with enzymatic activity (PI-cFDA+); ii) cells with enzymatic activity and permeable membrane (PI+cFDA+); and iii) cells with no enzymatic activity and permeable cell membrane (PI+cFDA-) (35,36).

The PI-cFDA+ subpopulations of *L. fermentum* cells in JM reduced after exposure to simulated gastric digestion at zero ($6.0 \pm 0.18\%$) and 45 days of storage ($0.3 \pm 0.13\%$) and increased at 90 days of storage ($19.9 \pm 0.64\%$; $p < 0.05$). At time zero, the PI-cFDA+ subpopulation of *L. fermentum* cells in JFM did not change after exposure to gastric conditions ($p \geq 0.05$); however, it increased ($p < 0.05$) until the end of storage (reaching $18.9 \pm 0.7\%$). After exposure to intestinal conditions, there was an increase ($p < 0.05$) in this cell subpopulation at the beginning (6.0 ± 0.76 to $17.20 \pm 0.68\%$) and end of storage (18.9 ± 0.7 to $24.6 \pm 0.78\%$) in both nutraceuticals.

Otherwise, the PI+cFDA+ subpopulation of *L. fermentum* cells was reduced in JM ($p < 0.05$) after exposure to gastric conditions at the beginning and end of storage ($15.8 \pm 0.65\%$ and $24.7 \pm 0.16\%$, respectively). Similar behavior was observed in JM and JFM when exposed to intestinal conditions, with values of $34.1 \pm 0.54\%$ and $9.7 \pm 0.75\%$, respectively, at the

beginning of storage and of $12.1 \pm 0.08\%$ and $7.4 \pm 0.87\%$, respectively, at the end of storage. The PI+cFDA- cell subpopulations decreased in JM and JFM after exposure to simulated gastric conditions ($p < 0.05$). On day 90 of storage, JM had the highest PI-cFDA+ cell subpopulation ($19.9 \pm 0.64\%$). The lowest PI+cFDA- cell subpopulations in JM and JFM were detected at day zero of storage (9.9 ± 0.89 and $9.9 \pm 0.7\%$, respectively).

On day 45 of storage, after exposure to simulated gastric digestion, JM had the highest size of PI+cFDA- cell subpopulation ($57.5 \pm 0.6\%$) and the smallest size of PI-cFDA+ cell subpopulation ($0.3 \pm 0.13\%$) ($p < 0.05$). After exposure to the simulated intestinal conditions, JFM had the highest PI-cFDA+ cell subpopulation ($29.1 \pm 0.66\%$) and the smallest PI+cFDA- cell subpopulation ($4.4 \pm 0.41\%$) ($p < 0.05$).

Contents and bioaccessibility of phenolic compounds in the nutraceuticals during exposure to SGD

The contents of phenolic compounds in JM and JFM during exposure to SGD are shown in Table 2. At all examined storage times, the ellagic acid content increased ($p < 0.05$) in JM and JFM after exposure to the intestinal phase, with values ranging from 103.8 ± 4.9 to 262.2 ± 9.8 mg/100g in JM and from 18.5 ± 0.6 to 47.9 ± 2.9 mg/100g in JFM.

JM and JFM showed a reduction ($p < 0.05$) in cyanidin content during SGD. During the measured storage period, the lowest contents of cyanidin were detected after exposure to intestinal conditions, with values ranging from 5.9 ± 0.3 to 148.3 ± 11.7 mg/100g in JM and from 8.4 ± 0.8 to 50.2 ± 0.1 mg/100g in JFM ($p < 0.05$).

At time zero, the cyanidin-3-*O*-glucoside contents did not change in JM (5.9 ± 0.3 and 9.3 ± 0.3 mg/100g) and JFM (8.4 ± 0.8 and 5.2 ± 0.3 mg/100g) after exposure to simulated intestinal digestion ($p \geq 0.05$). On days 45 and 90 of storage, the cyanidin-3-*O*-glucoside content in JFM did not change when exposed to the simulated oral (35.5 ± 2.5 mg/100g and

89.9 $\pm$ 3.0 mg/100g) and gastric digestion (56.0 $\pm$ 2.8 mg/100g and 107.1 $\pm$ 8.2 mg/100g) ($p \geq 0.05$).

After exposure to simulated gastric conditions, the cyanidin-3-*O*-glucoside content (56.0 $\pm$ 2.8 to 278.2 $\pm$ 21.8 mg/100g) was higher than the other phases of the simulated digestion. The lowest cyanidin-3-*O*-glucoside content was detected at the end of the SGD (1.9 $\pm$ 0.3 to 9.9 $\pm$ 1.1 mg/100g). In contrast, the contents of ellagic acid (18.5 $\pm$ 0.6 to 262.2 $\pm$ 9.8 mg/100g) and gallic acid (1.7 $\pm$ 0.2 to 13.5 $\pm$ 0.6 mg/100g) increased. Regarding the storage period, the highest ellagic acid and cyanidin-3-*O*-glucoside contents were detected at the end of storage (90 days).

The results of the potential bioaccessibility of the phenolic compounds in JM and JFM are shown in Fig. 2. Cyanidin-3-*O*-glucoside showed the highest bioaccessibility after exposure to simulated gastric digestion ($p < 0.05$). The highest bioaccessibility of cyanidin-3-*O*-glucoside in JM and JFM was detected on day 90 of storage; however, JFM had higher bioaccessibility (132.22 $\pm$ 0.03%) than JM (34.66 $\pm$ 0.14%) ($p < 0.05$). Similarly, JFM showed higher bioaccessibility of ellagic acid (143.29 $\pm$ 0.10%) than JM (78.39 $\pm$ 0.22%) ($p < 0.05$). At the end of SGD, cyanidin-3-*O*-glucoside showed decreased bioaccessibility. However, it was higher ($p < 0.05$) in JFM (12.22 $\pm$ 0.12%) than in JM (2.00 $\pm$ 0.07%).

Antioxidant capacity of nutraceuticals during exposure to SGD

The antioxidant capacity of JM and JFM exposed to SGD and evaluated with ABTS, DPPH, and FRAP methods is shown in Table 3. The antioxidant capacity of JM and JFM decreased during storage ($p < 0.05$). JM and JFM reached the highest antioxidant capacity after exposure to the gastric phase. Notably, JFM had greater antioxidant capacity than JM on days zero and 90 of storage ($p < 0.05$), with values ranging from 16.75 $\pm$ 0.21 to 13.13 $\pm$ 0.16 μ mol Trolox TEAC/g when determined with the ABTS method, 8.75 $\pm$ 0.12 to 5.09 $\pm$ 0.05 μ mol

Trolox TEAC/g when determined with the DPPH method, and 74.09 ± 0.09 to 72.32 ± 0.68 $\mu\text{mol FeSO}_4/\text{g}$ when determined with the FRAP method.

After exposure to intestinal conditions, there was a reduction ($p < 0.05$) in the antioxidant capacity of nutraceuticals. When measured by the decrease of the ABTS radical, JM and JFM had an antioxidant capacity of 11.10 ± 0.09 and 11.82 ± 0.24 $\mu\text{mol Trolox TEAC/g}$, respectively, on day zero, and 6.58 ± 0.11 and 7.94 ± 0.08 $\mu\text{mol Trolox TEAC/g}$, respectively, on day 90 of storage. When determined by the reduction of the DPPH radical, JM and JFM had an antioxidant capacity of 6.75 ± 0.11 and 5.21 ± 0.03 $\mu\text{mol Trolox TEAC/g}$, respectively, on day zero, and of 4.11 ± 0.03 and 3.90 ± 0.05 $\mu\text{mol Trolox TEAC/g}$, on day 90 of storage. This reduction was also identified when measured using the FRAP method. JM had antioxidant capacity of 67.05 ± 0.06 and 64.07 ± 0.11 $\mu\text{mol FeSO}_4/\text{g}$ on day zero and 90 days of storage, respectively, while JFM reached values of 62.39 ± 0.52 and 60.79 ± 0.22 $\mu\text{mol FeSO}_4/\text{g}$, at the beginning and end of storage, respectively.

The antioxidant capacity of JM and JFM was maintained until the end of SGD. Overall, there was no significant difference in the antioxidant capacity of JM and JFM when exposed to the duodenum and ileum conditions. The results indicate that even with reductions, JM and JFM maintained their antioxidant capacity until the end of storage.

Chemometric analysis

PCA evaluated the differences between JM and JFM when exposed to SGD considering the physiological status of *L. fermentum* cells and the contents of phenolic compounds at day zero, 45, and 90 of storage (Fig. 3). The PCA analysis expounded the data with a total variance of 69.60% (Dim 1: 43.80% and Dim 2: 25.80%). JFM (day zero and 90) and JM (day zero) were in the upper quadrants, with the highest values for live *L. fermentum* cells in the simulated oral and intestinal digestion phases and for cyanidin-3-*O*-glucoside content at the end of

digestion. On day 45 of storage, JFM and JM were in the lower quadrants and distant from all measured variables, indicating the least expressive results. At the end of storage, JM appeared next to the cyanidin-3-*O*-glucoside contents. JFM presented better results overall than JM regarding the measured variables.

Discussion

Nutraceuticals are formulations that deliver bioactive compounds with proven health benefits (40). A stable powdered material can be obtained using freeze-drying, as demonstrated in a previous study with FJP (10). However, ensuring the viability of these microorganisms is crucial for delivering health benefits to the consumer (41). After the storage period and before exposure to SGD, the viable cell counts of *L. fermentum* in JFM was about 6.9 log CFU/g.

During exposure to SGD, the viable cell counts of *L. fermentum* decreased, with the most significant reduction occurring after exposure to the gastric phase. Throughout the gastrointestinal tract, these cells encounter various stressful conditions. The stomach acidity inhibits the activity of glycolytic enzymes, disrupts proton pumps, and ultimately reduces bacterial survival. In response to these challenging conditions, some cells develop adaptation mechanisms to restore their metabolism and withstand the stress encountered in these environments (43,44,45). The presence of FJP in nutraceuticals may have contributed to the survival of *L. fermentum* cells until reaching the colon, which is their target site and a key location for their role in modulating the intestinal microbiota (40). FOS and the phenolic compounds in FJP could contribute to JFM exhibiting the highest viable cell counts. Like other dietary fibers, FOS remains unchanged during gastrointestinal digestion and reaches the colon, where they are metabolized by intestinal bacteria through fermentation (10). The ability of FJP to support strain survival has been previously reported (10,11).

Immediately before exposure to SGD, the nutraceuticals displayed a high percentage of subpopulations of injured *L. fermentum* cells, which may result from the freeze-drying process used during their formulation. Freeze-drying can stabilize and preserve probiotic cells; however, during this process, the cells are subjected to stressful conditions that can damage them due to the formation of ice crystals (46,47). Cryoprotectants can mitigate this damage by replacing the water molecules removed during dehydration, thereby maintaining cellular integrity (46). When exposed to gastric conditions, JM and JFM exhibited a high subpopulation of damaged cells; however, the size of the subpopulation of live cells was also significant. The presence of damaged cells in this digestion phase was probably anticipated due to the stress conditions encountered in the stomach. The acidic environment of the stomach induces changes in the cell membrane, DNA damage, and alterations in peptidoglycan components (48).

At the end of the SGD, although JM and JFM showed a subpopulation of dead *L. fermentum* cells, they were still able to maintain a significant subpopulation of live cells and cells with membrane damage yet exhibiting enzymatic activity, which is characteristic of the VBNC (viable but not cultivable) state (33). The damage to these cells makes it difficult to enumerate the colonies on solid media (17). However, metabolic activity, though reduced, is still preserved, along with a decrease in nutrient transport and cellular respiration rate (49). Under favorable conditions, these VBNC cells can recover their growth capacity (50). Nevertheless, JFM exhibited a higher subpopulation of viable cells and a lower subpopulation of dead cells at the end of the SGD. This suggests some resistance to gastrointestinal conditions (51) and potentially the protective effect of the phenolic compounds in FJP and FOS. FOS, in addition to functioning as a cryoprotectant, can withstand acidic conditions and the action of digestive enzymes due to their stable structure (52). Combining phenolic compounds in FJP and FOS with *L. fermentum* strains could help to reduce the mortality rate and stimulate microbial growth (52).

Measuring anthocyanins and phenolic acids in JM and JFM is crucial, as these are the primary compounds in jabuticaba. During SGD, the anthocyanin content decreased, reaching its lowest values in the intestinal phase. However, after exposure to gastric conditions, the anthocyanin content increased when JM and JFM exhibited the highest anthocyanin content. The acid environment of the stomach is favorable for the stability and absorption of anthocyanins (53,54). However, in the intestinal phase, the increase in pH leads to a rise in the number of hydroxyl groups, resulting in a reduction in stability (55,56). During this phase of SGD, some of the ingested anthocyanins undergo enzymatic action, promoting glycosylation and releasing low molecular weight phenolic acids metabolized by the intestinal microbiota (57). Parallely, the ellagic acid content increased in the intestinal phase. This acid is usually found in the condensed form, as ellagitannins, but its absorption is complex along the gastrointestinal tract (58,59). However, the intestinal microbiota converts these acids into different types of urolithins that exert numerous beneficial effects on health (60-63). A study conducted with an animal model of multiple sclerosis, which administered a diet rich in phenolic compounds, reported that ellagic acid interrupted the progression of autoimmune encephalomyelitis. It was suggested that this outcome was due to the association between the intestinal microbiota, produced metabolites, and enhanced immunity (64).

Phenolic compounds undergo various changes during gastrointestinal digestion. Therefore, assessing the bioaccessibility of these compounds in JM and JFM is important to understanding their potential health benefits (57,65). Bioaccessibility of food compounds depends on chemical structure, interactions with other compounds in the food matrix, genetic factors (66), and instability during intestinal transit (67). Cyanidin-3-*O*-glucoside and ellagic acid are the most abundant phenolic compounds in FJP (68), and they demonstrated bioaccessibility during simulated gastric digestion. The bioaccessibility of cyanidin-3-*O*-glucoside was higher in the gastric phase, with a considerable reduction by the end of the

digestive process, indicating loss at the intestinal level (69). A study on anthocyanins from fruits exposed to in vitro gastrointestinal digestion found that anthocyanins were stable in the gastric phase. Still, there was minimal recovery in the intestinal phase, leading to low bioavailability (70).

The intestinal instability of anthocyanins is likely due to chemical decomposition at basic pH (71), which causes a transition from the predominantly stable flavylium cation form to the highly unstable quinoidal base form (72). In the gastric phase, the ellagic acid present in JFM showed greater bioaccessibility at the end of storage than JM. However, the bioaccessibility of this phenolic acid, along with that of gallic acid, was more pronounced at the end of the SGD. Ellagic acid in the intestine can modulate the intestinal microbiota that metabolizes it and releases urolithins (58,73). A study with ellagic acid supplementation reported a modulatory effect on the intestinal microbiota through increased abundance of beneficial bacteria and consequently reduction of intestinal damage and oxidative stress (74). The presence of ellagic acid, gallic acid, and anthocyanins until the end of the SGD corroborates the maintenance of the antioxidant capacity of JM and JFM.

The antioxidant capacity of phenolic compounds may have contributed to the protective effect on *L. fermentum* cells. The presence of phenolic compounds in the composition of nutraceuticals containing probiotics may be favorable to their viability since these compounds can remove oxygen from the environment due to their antioxidant capacity (75), making the environment suitable for the growth of these microorganisms (76,77). During SGD, antioxidant capacity was reduced; however, the most expressive values were observed after exposure to gastric conditions, accompanied by a greater content of cyanidin-3-*O*-glucoside. During digestion, antioxidant capacity is variable and depends on the availability and release of phenolic compounds in nutraceuticals, pH variations, and enzymatic action (78,79). JM and JFM maintained antioxidant capacity throughout SGD in all assays tested. Maintaining

antioxidant capacity throughout the gastrointestinal tract reduces the impacts generated in the digestive process due to its ability to shield against oxidative stress, reach the colon, and exert a modulatory effect on the intestinal microbiota (25).

An overview of the results of this study was summarized using PCA analysis. It showed that JFM produced the most satisfactory results in some examined variables, highlighting the ability of phenolic compounds found in FJP and FOS to help protect and maintain probiotic cell viability throughout SGD. Additionally, phenolic compounds in JFM are metabolized by the intestinal microbiota, resulting in new metabolites, which, together with probiotic cells, can generate an intestinal protection barrier against pathogens (79).

Conclusion

Nutraceuticals combining FJP and *L. fermentum* strains potentially probiotic maintained their bioactive components during 90 days of storage. During the 90 days of storage, when JM and JFM were exposed to SGD, the results indicated changes in the phenolic compound contents and metabolic status of *L. fermentum* cells, consequently affecting the antioxidant capacity of the nutraceuticals. Additionally, JM and JFM maintained a high subpopulation of active *L. fermentum* and high contents and bioaccessibility of phenolic compounds during SGD. FOS could have led to JFM performing better than JM in the measured variables during the examined long-term storage. The results evidence the efficacy of the bioactive components accounting for the nutraceutical properties of JM and JFM in reaching the colonic environment, where they could induce changes in the intestinal microbiota and cause systemic beneficial health effects. However, further research with in vivo models is warranted to advance and confirm the health benefits of these novel nutraceuticals.

References

(1) Borges, L. L. R.; Oliveira, L. L.; Freitas, V. V.; Leite Júnior, B. R. C.; Nascimento, A. L. A. A.; Castro, G. A. D.; Fernandes, S. A.; Stringheta, P. C. Digestive enzymes inhibition,

- antioxidant and antiglycation activities of phenolic compounds from jabuticaba (*Plinia cauliflora*) peel. *Food Biosci.* **2022**, 50.
- (2) Bueno, T. M.; Queiroz, F.; Santos, J. C. C.; Furtado, M. A. B.; Schiassi, M. C. E. V.; Borges, S. S.; Figueiredo, J. A. Sequential extraction of anthocyanins and pectin from jabuticaba (*Plinia cauliflora*) peel: Peel pretreatment effect and ultrasound-assisted extraction. *An Acad Bras Cienc.* **2024**, 96.
- (3) de Oliveira, J. N.; Albuquerque, T. M. R.; Lima, M. S.; Wartha, E. R. S. A.; Monteiro, M.; Nascimento, Y. M.; Tavares, J. F.; Silva, M. S.; Souza, E. L.; Moreira, J. J. S. Evaluating the potential prebiotic effects of umbu-cajá (*Spondias* spp.) fruit processing by-product flour on the human intestinal microbiota. *LWT – Food Sci Technol.* **2024**, 210: 116764.
- (4) Krishna, V. V.; Mkondiwa, M. Economics of crop residue management. *An Rev Res Econ.* **2023**, 15, 19-39.
- (5) Pagliarini, C. L.; Pagliarini, M. A.; Santos, V. A. F. O.; Steffens, C. A.; Hoff, R. B.; Dognini, J.; Crestani, I.; Dacoreggio, M. V.; Bagatini, L.; Kempka, A. P. Vinegars from fruits of *Myrciaria cauliflora* (Mart.) O.Berg and *Myrciaria jaboticaba* (Vell.) Berg: Phytochemical, volatile and, sensory profiles, antioxidant activity and chemical characteristics. *Rese Squa.* **2023**, 1-23.
- (6) Mateus, A. R. S.; Pena, A.; Sendón, R.; Almeida, C.; Nieto, G. A.; Khwaldia, K.; Silva, A. S. By-products of dates, cherries, plums and artichokes: A source of valuable bioactive compounds. *Tren Food Scie Technol.* **2023**, 131, 220-243.
- (7) Osorio, L. L. D. R.; Flórez-López, E.; Grande-Tovar, C. D. The Potential of Selected Agri-Food Loss and Waste to Contribute to a Circular Economy: Applications in the Food, Cosmetic and Pharmaceutical Industries. *Molecules* **2021**, 26, 515.
- (8) Vignesh, A.; Amal, T. C.; Sarvalingam, A.; Vasanth, K. A review on the influence of nutraceuticals and functional foods on health. *Food Chem Adv.* **2024**, 5.
- (9) Botta-Arias, V. L.; Ramos-Escudero, F.; Muñoz, A. M.; Anticona, M. Nutritional composition, phenolic compounds, and sensory evaluation of osmosonicated orange peel snacks impregnated with plant extracts. *App Food Res.* **2024**, 4.
- (10) Nascimento, H. M. A.; Silva, J. Y. P.; Oliveira, S. P. A.; Sampaio, K. B.; Monteiro, M.; Souza, F. S.; Medeiros, E. S.; Albuquerque, T. M. R.; Souza, E. L. Thermal and storage stability of novel nutraceuticals combining potential probiotic *Limosilactobacillus fermentum* strains and freeze-dried jabuticaba [*Myrciaria cauliflora* (Mart.) O. Berg] peel. *Braz J. Microbiol.* **2025**, 56, 23-38.
- (11) Silva, J. Y. P.; Nascimento, H. M. A.; Albuquerque, T. M. R.; Revealing the potential impacts of nutraceuticals formulated with freeze-dried jabuticaba peel and *Limosilactobacillus fermentum* strains candidates for probiotic use on human intestinal microbiota. *Probiotic Antimicrob Proteins* **2023**, 16, 1773-1789.
- (12) Lippolis, T.; Cofano, M.; Caponio, G. R.; De Nunzio, V.; Notarnicola, M. Bioaccessibility and bioavailability of diet polyphenols and their modulation of gut microbiota. *Int. J. Mol. Sci.* **2023**, 24, 3813.
- (13) Govaert, M.; Rotsaert, C.; Vannieuwenhuyse, C.; Duysburgh, C.; Medlin, S.; Marzorati, M.; Jarrett, H. Survival of Probiotic bacterial cells in the upper gastrointestinal tract and the effect of the surviving population on the colonic microbial community activity and composition. *Nutrients* **2024**, 16, 2791.
- (14) Silva, S. R. F.; Rocha, S. S.; Silva, J. Y. P.; Medeiros, V. P. B.; Aburjaile, F. F.; Carvalho, R. D. O.; Silva, M. S.; Tavares, J. F.; Nascimento, Y. M.; Lima, M. S.; Sassi, C. F. C.; Monteiro, M.; Alves, J. L. B.; Albuquerque, T. M. R.; Oliveira, M. E. G.; Souza, E. L. Integrative investigation of the potential impacts of *Pilosocereus gounellei* (A. Weber ex K. Schum. Bly. Ex Rowl) cladodes on the human intestinal microbiota. *J Funct Foods* **2024**, 122.

- (15) Lau, B. T.; Almeda, A.; Schauer, M.; McNamara, M.; Bai, X.; Meng, O.; Partha, M.; Grimes, S. M.; Lee, H.; Heestand, G. M.; Ji, H. P. Single-molecule methylation profiles of cell-free DNA in cancer with nanopore sequencing. *Gen Med.* **2023**, 15, 33.
- (16) Ma, T.; Shen, X.; Shi, X.; Sakandar, H. A.; Quan, K.; Li, Y.; Jin, H.; Kwok, L.; Zhang, H.; Sun, Z. Targeting gut microbiota and metabolism as the major probiotic mechanism - An evidence-based review. *Tren Food Scie Technol.* **2023**, 138, 178-198.
- (17) Oliveira, S. P. A.; Nascimento, H. M. A.; Rodrigues, N. P. A.; Sampaio, K. B.; Lima, M. S.; Conceição, M. L.; Souza, E. L. Different parts from the whole red beet (*Beta vulgaris* L.) valorization with stimulatory effects on probiotic lactobacilli and protection against gastrointestinal conditions. *Food Biosci.* **2023**, 52.
- (18) Seguenka, B.; Nascimento, L. H.; Feiden, T.; Fernandes, I. A.; Magro, J. D.; Junges, A.; Valduga, E.; Steffens, J. Ultrasound-assisted extraction and concentration of phenolic compounds from jaboticaba sabará (*Plinia peruviana* (Poir.) Govaerts) peel by nanofiltration membrane. *Food Chem.* **2024**, 30, 453.
- (19) Vaz, A. A.; Odrizola-Serrano, I.; Oms-Oliu, G.; Martin-Belloso, O. Physicochemical properties and bioaccessibility of phenolic compounds of dietary fibre concentrates from vegetable by-products. *Foods.* **2022**, 11, 2578.
- (20) Matsumura, Y.; Kitabatake, M.; Kayano, S.; Ito, T. Dietary phenolic compounds: their health benefits and association with the gut microbiota. *Antioxidants* **2023**, 12, 4.
- (21) Eseberri, I.; Trepiana, J.; Léniz, A.; Gómez-García, I.; Carr-Ugarte, H.; González, M.; Portillo, M. P. Variability in the beneficial effects of phenolic compounds: A review. *Nutrients* **2022**, 14, 1925.
- (22) Farias, D. P.; Araújo, F. F.; Neri-Numa, I. A.; Dias-Audibert, F. L.; Delafiori, J.; Catharino, R. R.; Pastore, G. M. Effect of in vitro digestion on the bioaccessibility and bioactivity of phenolic compounds in fractions of *Eugenia pyriformis* fruit. *Food Res Int.* **2021**, 150.
- (23) Kaşıkçı, M. B.; Bağdatlıoğlu, N. Bioaccessibility of phenolic compounds and antioxidant activity in raw and pickled capers. *J Food Sci Techol.* **2024**, 61, 106-116.
- (24) Garcia, E. F.; Luciano, W. A.; Xavier, D. E.; Costa, W. C. A.; Oliveira, K. S.; Franco, O. L.; Moraes Júnior, M. A.; Lucena, B. T. L.; Picão, R. C.; Magnani, M.; Saarela, M.; Souza, E. L. Identification of lactic acid bacteria in fruit pulp processing byproducts and potential probiotic properties of selected lactobacillus strains. *Front Microbiol.* **2016**, 30,1371.
- (25) Cruz Neto, J. P. R.; Oliveira, A. M.; Oliveira, K. A. R.; Sampaio, K. B.; Dutra, M. L. V.; Freire, M. O. L.; Souza, E. L.; Alves, J. L. B. Safety evaluation of a novel potentially probiotic *Limosilactobacillus fermentum* in rats. *Probiotics Anticarb Proteins* **2024**, 16,752-762.
- (26) Freire, M. O. L.; Nascimento, L. C. P.; Oliveira, K. A. R.; Oliveira, A. M.; Napoleão, T. H.; Lima, M. S.; Lagranha, C. J.; Souza, E. L.; Alves, J. L. B. Effects of a mixed *Limosilactobacillus fermentum* formulation with claimed probiotic properties on cardiometabolic variables, biomarkers of inflammation and oxidative stress in male rats fed a high-fat diet. *Foods.* **2021**, 10, 2202.
- (27) Nascimento, D. S.; Sampaio, K. B.; Nascimento, Y. M.; Souza, T. A.; Souza, F. S.; Chaves Júnior, J. V.; Tavares, J. F.; Silva, M. S.; Souza, E. L. Evaluating the stability of a novel nutraceutical formulation combining probiotic *Limosilactobacillus fermentum* 296, quercetin, and resveratrol under different storage conditions. *Probiotics Antimicrob Proteins* **2022**, 1–13.
- (28) Sampaio, K. B.; Alves, J. L. B.; Nascimento, Y. M.; Tavares, J. F.; Silva, M. S.; Nascimento, D. S.; Lima, M. S.; Rodrigues, N. P. A.; Garcia, E. F.; Souza, E. L. Nutraceutical formulations combining *Limosilactobacillus fermentum*, quercetin, and or resveratrol with beneficial impacts on the abundance of intestinal bacterial populations, metabolite production, and antioxidant capacity during colonic fermentation. *Food Res Int.* **2022**, 161, 111800.

- (29) Guo, Y.; Zhang, P.; Liu, Y.; Zha, L.; Ling, W.; Guo, H. A dose-response evaluation of purified anthocyanins on inflammatory and oxidative biomarkers and metabolic risk factors in healthy young adults: A randomized controlled trial. *Nutrition*, v. 74, 2020. <https://doi.org/10.1016/j.nut.2020.110745>
- (30) Di, L.; Ma, W.; Kang, W.; Huang, Y.; Wu, Z.; Yin, B.; Yang, R.; Liu, X.; Pan, L.; Yang, J.; Wei, L.; Gu, R. Synergistic combination of cryoprotectants for high freeze-dried survival rate and viable cell counts of *Streptococcus thermophilus*. *Dry Technol.* **2022**, 1–10.
- (31) Sampaio, K. B.; Nascimento, Y. M.; Tavares, J. F.; Cavalcanti, M. T.; Alves, J. L. B.; Garcia, E. F.; Souza, E. L. Development and in vitro evaluation of novel nutraceutical formulations composed of *Limosilactobacillus fermentum*, quercetin and/or resveratrol. *Food Chem.* **2021**, 342, 128264.
- (32) Minekus, M.; Alvinger, M.; Alvito, P.; Ballance, S.; Bohn, T.; Bourlieu, C.; Carriere, F.; Boutrou, R.; Corredig, M.; Dupont, D.; Dufour, C.; Egger, L.; Golding, M.; Karakaya, S.; Kirkhus, B.; Le Feunteun, S.; Lesmes, U.; Macierzanka, A.; Mackie, A.; Marze, S.; McClements, D. J.; Ménard, O.; Recio, I.; Santos, C. N.; Singh, R. P.; Vegarud, G. E.; Wickham, M. S. J.; Weitschies, W.; Brodkorb, A. A standardised static *in vitro* digestion method suitable for food – an international consensus. *Food Funct.* **2014**, 5, 1113–1124.
- (33) Rodrigues, N. P. A.; Garcia, E. F.; Sampaio, K. B.; Nascimento, H. M. A.; Guedes, J. P. S.; Souza, E. L. Dynamics of physiological responses of potentially probiotic fruit-derived *Limosilactobacillus fermentum* in apple and orange juices during refrigeration storage and exposure to simulated gastrointestinal conditions. *Arch Microbiol.* **2022**, 204, 38.
- (34) Paparella, A.; Taccogna, L.; Aguzzi, I.; Chaves-López, C.; Serio, A.; Marsilio, F.; Suzzi, G. Flow cytometric assessment of the antimicrobial activity of essential oils against *Listeria monocytogenes*. *Food Cont.* **2008**, 19, 1174–1182.
- (35) Rodrigues, N.P.A.; Garcia, E.F.; de Souza, E.L. Selection of lactic acid bacteria with promising probiotic aptitudes from fruit and ability to survive in different food matrices. *Braz J Microbiol.* 2021, **52**, 2257–2269.
- (36) Gandhi, A.; Shah, N. P. Effect of salt on cell viability and membrane integrity of *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus casei* and *Bifidobacterium longum* as observed by flow cytometry. *Food Microbiol.* **2015**, 49, 197–202.
- (37) Brand-Williams, W.; Cuvelier, M. E.; Berset, C. L. W. T. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *LWT-Food Sci Technol.* **1995**, 28, 25–30.
- (38) Re, R.; Pellegrini, N.; Proteggente, A.; Pannala, A.; Yang, M.; Rice-Evans, C. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Rad Biol Med.* **1999**, 26, 1231–1237.
- (39) Benzie, I. F. F.; Strain, J. J. The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of “antioxidant power”: The FRAP assay. *Anal Bioc.* **1996**, 239, 70–76.
- (40) Perna, A.; Venditti, N.; Merolla, F.; Fusco, S.; Guerra, G.; Zoroddu, S.; De Luca, A.; Bagella, L. Nutraceuticals in pregnancy: A special focus on probiotics. *Int J Mol Sci.* **2024**, 25, 9688.
- (41) Sampaio, K. B.; Alves, J. L. B.; Nascimento, Y. M.; Tavares, J. F.; Silva, M. S.; Nascimento, D. S.; Rodrigues, N. P. A.; Monteiro, M. C.; Garcia, E. F.; Souza, E. L. Effects of simulated gastrointestinal conditions on combined potentially probiotic *Limosilactobacillus fermentum* 296, quercetin, and/or resveratrol as bioactive components of novel nutraceuticals. *Probiotics Antimicrob Proteins* **2024**, 16, 308–319.
- (42) Food and Agriculture Organization - World Health Organization (FAO/WHO) Probiotics in food: health and nutritional properties and guidelines for evaluation. FAO. **2006**. Internet: <https://www.fao.org/3/a0512e/a0512e.pdf>. Accessed 13 Sept 2024.

- (43) Han, S.; Lu, Y.; Xie, J.; Fei, Y.; Zheng, G.; Wang, Z.; Liu, J.; Lv, L.; Ling, Z.; Berglund, B.; Yao, M.; Li, L. Probiotic gastrointestinal transit and colonization after oral administration: A long journey. *Front Cel Infec Microb.* **2021**, 11.
- (44) Kathiriya, M. R.; Vekariya, Y. V.; Hati, S. Understanding the probiotic bacterial responses against various stresses in food matrix and gastrointestinal tract: A review. *Probiotics Antimicrb Proteins* **2023**, 15, 1032-1048.
- (45) Bustos, A. Y.; Taranto, M. P.; Gerez, C. L.; Agriopoulou, S.; Smaoui, S.; Varzakas, T.; El Enshasy, H. A. Recent advances in the understanding of stress resistance mechanisms in probiotics: Relevance for the design of functional food systems. *Probiotics Antimicrob Proteins* **2025**, 17, 138-158.
- (46) Oluwatosin, S. O.; Tai, V. L.; Fagan-Endres, M. A. Sucrose, maltodextrin and inulin efficacy as cryoprotectant, preservative and prebiotic – towards a freeze dried *Lactobacillus plantarum* topical probiotic. *Biotechnol Rep.* **2022**, 33.
- (47) Tyagi, N.; Gidlo, Z.; Osanlóo, D. T.; Collier, E. S.; Kadekar, S.; Ringstad, L.; Fureby, A. M.; Roos, S. The impact of formulation and freeze drying on the properties and performance of freeze-dried *Limosilactobacillus reuteri* R2LC. *App Microbiol.* **2023**, 24, 1370-1387.
- (48) Castro-López, C.; Romero-Luna, H. E.; García, H. S.; Vallejo-Cordoba, B.; González-Córdova, A. F.; Hernández-Mendonza, A. Key stress response mechanisms of probiotics during their journey through the digestive system: A review. *Probiotics Antimicrob Proteins* **2023**, 15, 1250-1270.
- (49) Pazos-Rojas, L. A.; Cuellar-Sánchez, A.; Romero-Cerón, A. L.; Rivera-Urbalejo, A.; Van Dillewijn, P.; Luna-Vital, D. A.; Muñoz-Rojas, J.; Morales-García, Y. E.; Bustillos-Cristales, M. R. The viable but non-culturable (VBNC) state, a poorly explored aspect of beneficial bacteria. *Microorganisms* **2024**, 12, 39.
- (50) Cheng, S.; Li, Z.; Bai, X.; Feng, J.; Su, R.; Song, L.; Yang, H.; Zhan, X.; Xia, X.; Lu, X.; Shi, C. The biochemical characteristics of viable but nonculturable state *Yersinia enterocolitica* induced by lactic acid stress and its presence in food systems. *Food Res Int.* **2023**, 170.
- (51) Jumazhanova, M.; Kakimova, Z.; Zharykbasov, Y.; Kassymov, S.; Zhumadilova, G.; Muratbayev, A.; Tashybayeva, M.; Suychinov, A. Effect of the encapsulation process on the viability of probiotics in a simulated gastrointestinal tract model medium. *Process.* **2023**, 11, 2757.
- (52) Poopan, B.; Kasorn, A.; Puttarat, N.; Kasemwong, K.; Pachekrepapol, U.; Taweechotipatr, M. Freeze drying microencapsulation using whey protein, maltodextrin and corn powder improved survivability of probiotics during storage. *Food Sci Biotechnol.* **2025**, 34, 959-970.
- (53) Gui, H.; Sun, L.; Liu, R.; Si, X.; Li, D.; Wang, Y.; Shu, C.; Sun, X.; Jiang, Q.; Qiao, Y.; Li, B.; Tian, J. Current knowledge of anthocyanin metabolism in the digestive tract: absorption, distribution, degradation, and interconversion. *Crit Rev Food Sci Nut.* **2023**, 63, 5953-5966.
- (54) Kang, H.; Ko, M.; Chung, M. Anthocyanin structure and pH dependent extraction characteristics from blueberries (*Vaccinium corymbosum*) and chokeberries (*Aronia melanocarpa*) in subcritical water state. *Foods* **2021**, 10, 257.
- (55) Li, Q.; Zhang, F.; Zhenzhen, W.; Feng, Y.; Han, Y. Advances in the preparation, stability, metabolism, and physiological roles of anthocyanins: A review. *Foods* **2023**, 12, 3969.
- (56) Chua, L. S.; Thong, H. Y.; Soo, J. Effect of pH on the extraction and stability of anthocyanins from jaboticaba berries. *Food Chem Adv.* **2024**, 5.
- (57) Kumkum, R.; Astron-Mourney, K.; McNeill, B. A.; Hernández, D.; Rivera, L. R. Bioavailability of anthocyanins: Whole foods versus extracts. *Nutrients* **2024**, 16, 1403.

- (58) He, F.; Bian, Y.; Zhao, Y.; Xia, M.; Liu, S.; Gui, J.; Hou, X.; Fang, Y. In vitro conversion of ellagic acid to urolithin A by different gut microbiota of urolithin metabotype A. *Appl Microbiol Biotechnol.* **2024**, 108, 215.
- (59) Iglesias-Aguirre, C. E.; Garcia-Villalba, R.; Beltrán, D.; Frutos-Lisón, M. D.; Espín, J. C.; Tomás-Barberán, F. A.; Selma, M. V. Gut bacteria involved in ellagic acid metabolism to yield humanurolithin metabotypes revealed. *J Agri Food Chem.* **2023**, 71, 4029-4035.
- (60) Liu, H.; Birk, J. W.; Provatas, A. A.; Vaziri, H.; Fan, N.; Rosenberg, D. W.; Gharaibeh, R. Z.; Jobin, C. Correlation between intestinal microbiota and urolithin metabolism in a human walnut dietary intervention. *BMC Microb.* **2024**, 24, 476.
- (61) Bouyahya, A.; El Omari, N.; El Hachlafi, N.; El Jemly, M.; Hakkour, M.; Balahbib, A.; El Menyiy, N.; Bakrim, S.; Mrabti, H. N.; Khouchlaa, A.; Mahomoodally, M. F.; Catauro, M.; Montesano, D.; Zengin, G. Chemical compounds of berry-derived polyphenols and their effects on gut microbiota, inflammation, and cancer. *Molecules* **2022**, 27, 10.
- (62) Khiabani, S. A.; Haghighat, S.; Khosroshahi, H. T.; Asgharzadeh, M.; Kafil, H. S. *Clostridium* species diversity in gut microbiota of patients with renal failure. *Microb Pathog.* **2022**, 169.
- (63) Iqbal, A. Z.; Javaid, N.; Hameeda, M. Synergic interactions between berry polyphenols and gut microbiota in cardiovascular diseases. *Med J Nutr Metabol.* **2022**, 15, 555-573.
- (64) Han, B.; Shi, L.; Bao, M.; Yu, F.; Zhang, Y.; Lu, X.; Wang, Y.; Li, D.; Lin, J.; Jia, W.; Li, X.; Zhang, Y. Dietary ellagic acid therapy for CNS autoimmunity: Targeting on *Alloprevotella rava* and propionate metabolism. *Microbiome* **2024**, 12, 114.
- (65) Dantas, A. M.; Fernandes, F. G.; Magnani, M.; Borges, G. S. C. Gastrointestinal digestion assays for evaluating the bioaccessibility of phenolic compounds in fruits and their derivatives: an overview. *Food Res Int.* **2023**, 170.
- (66) Liang, A.; Leonard, W.; Beasley, J. T.; Fang, Z.; Zhang, P.; Ranadheera, C. S. Anthocyanins-gut microbiota-health axis: A review. *Crit Rev Food Sci Nutr.* **2024**, 64, 7563-7588.
- (67) Nagar, E. E.; Okun, Z.; Shpigelman, A. In vitro bioaccessibility of polyphenolic compounds: The effect of dissolved oxygen and bile. *Food Chem.* **2023**, 404.
- (68) Inada, K. O. P.; Silva, T. B. R.; Lobo, L. A.; Domingues, R. M. C. P.; Perrone, D.; Monteiro, M. Bioaccessibility of phenolic compounds of jaboticaba (*Plinia jaboticaba*) peel and seed after simulated gastrointestinal digestion and gut microbiota fermentation. *J. Funct Foods.* **2020**, 67.
- (69) Colasanto, A.; Disco, V.; Travaglia, F.; Bordiga, M.; Coisson, J. D.; Arlorio, M.; Locatelli, M. Bioaccessibility of phenolic compounds during simulated gastrointestinal digestion of black rice (*Oryza sativa* L., cv. Artemide). *Food Chem.* **2025**, 472, 30.
- (70) Victoria-Campos, C. L.; Ornelas-Paz, J. J.; Rocha-Guzmán, N. E.; Gallegos-Infante, J. A.; Failla, M. L.; Pérez-Martínez, J. D.; Rios-Velasco, C.; Ibarra-Junquera, V. I. Gastrointestinal metabolism and bioaccessibility of selected anthocyanins isolated from commonly consumed fruits. *Food Chem.* **2022**, 383.
- (71) Bortolini, D. G.; Barros, L.; Maciel, G. M.; Peralta, R. M.; Corrêa, V. G.; Finimundy, T. C.; Haminiuk, C. W. I. Bioaccessibility performance of phenolic compounds from red fruits during simulated gastrointestinal digestion and colonic fermentation. *Food Sci Tech.* **2025**, 5, 569-577.
- (72) Teixeira, M.; De Luca, L.; Faria, A.; Bordiga, M.; Freitas, V.; Mateus, N.; Oliveira, H. First insights on the bioaccessibility and absorption of anthocyanins from edible flowers: wild pansy, cosmos, and cornflower. *Pharmaceuticals* **2024**, 17, 191.
- (73) Yang, Y.; Lee, P.; Wong, H.; Zhao, D. Oral supplementation of *Gordonibacter urolithinfaciens* promotes ellagic acid metabolism and urolithin bioavailability in mice. *Food Chem.* **2024**, 437.

- (74) Qin, W.; Xu, B.; Chen, Y.; Yang, W.; Xu, Y.; Huang, J.; Duo, T.; Mao, Y.; Zhou, G.; Yan, X.; Ma, L. Dietary ellagic acid supplementation attenuates intestinal damage and oxidative stress by regulating gut microbiota in weanling piglets. *Anim Nutr.* **2022**, *11*, 322-333.
- (75) Obayomi, O. V.; Olaniran, A. F.; Owa, S. O. Unveiling the role of functional foods with emphasis on prebiotics and probiotics in human health: A review. *J Funct Foods.* **2024**, 119.
- (76) Silva, G. S.; Moreira, F. I. N.; Albuquerque, T. M. R.; Abreu, T. L.; Souza, E. G. T.; Silva, L. R.; Marques, A. D. J. F.; Galvão, M. S.; Lima, M. S.; Souza, E. L.; Madruga, M. S.; Kurozawa, L. E.; Bezerra, T. K. A. Microencapsulated phenolic compounds from organic coffee husk: Impacts on human gut microbiota and *in vitro* prebiotic potential. *Food Res. Int.* **2025**, 201.
- (77) Zhang, Y.; Li, Y.; Ren, X.; Zhang, X.; Wu, Z.; Liu, L. The positive correlation of antioxidant activity and prebiotic effect about oat phenolic compounds. *Food Chem.* **2023**, 402.
- (78) Wanyo, P.; Chamsai, T.; Toontom, N.; Nghiep, L. K.; Tudpor, K. Differential effects of *in vitro* simulated digestion on antioxidant activity and bioaccessibility of phenolic compounds in purple rice bran extracts. *Molecules* **2024**, *29*, 13.
- (79) Wang, J.; Wei, B.; Wei, B.; Yu, H.; Thakur, K.; Wang, C.; Wei, Z. Evaluation of phenolics biotransformation and health promoting properties of blueberry juice following lactic acid bacteria fermentation. *Food Sci Tech.* **2023**, 43.
- (80) Cui, W.; Chen, F.; Sun, Z.; Cui, C.; Xu, B.; Shen, W.; Wan, F. Catabolism of phenolics from grape peel and its effects on gut microbiota during *in vitro* colonic fermentation. *J Sci Food Agric.* **2024**, *104*, 7182-7193.

Graphical abstract

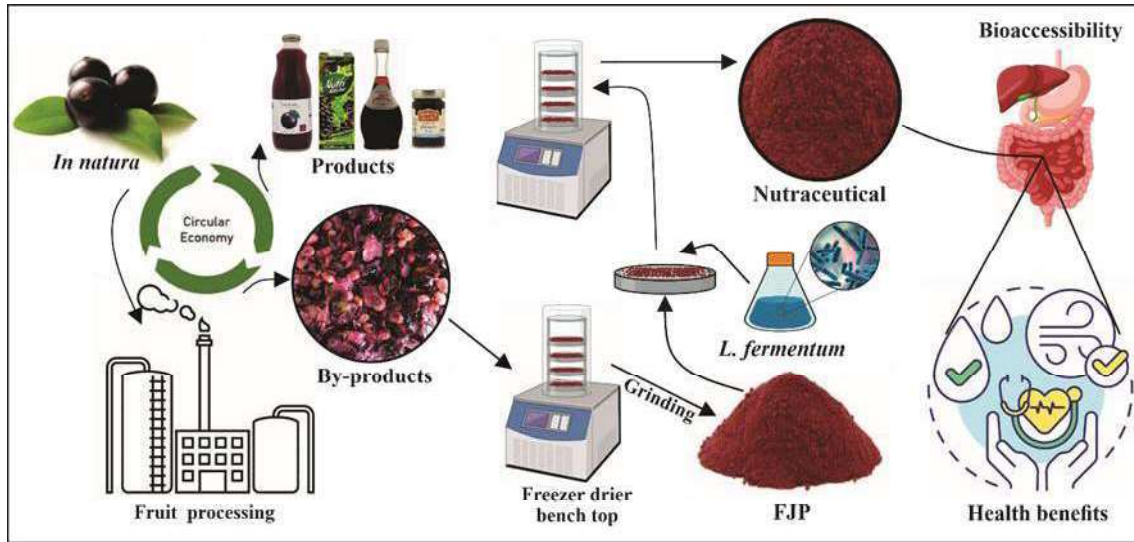


Table 1. Viable cell counts (Log CFU/mL; average $\pm$ standard deviation; n: 3) of *Limosilactobacillus fermentum* in JM and JFM on days zero, 45 and 90 of refrigerated storage (4 ± 0.5 °C) when exposed to simulated gastrointestinal digestion.

Nutraceuticals	Digestion step	Day of storage		
		Day 0	Day 45	Day 90
JM	Undigested*	9.55 ± 0.09^{Aa}	5.37 ± 0.15^{Ba}	5.28 ± 0.14^{Ba}
	Oral	9.30 ± 0.13^{Aa}	5.29 ± 0.12^{Ba}	5.13 ± 0.16^{Ba}
	Gastric	6.13 ± 0.09^{Ab}	4.19 ± 0.27^{Bb}	4.29 ± 0.09^{Bb}
	Duodenum	5.03 ± 0.16^{Ac}	3.95 ± 0.13^{Bb}	4.12 ± 0.18^{Bb}
	Ileum	4.81 ± 0.26^{Ac}	3.84 ± 0.20^{Bb}	4.08 ± 0.23^{Bb}
JFM	Undigested	9.53 ± 0.12^{Aa}	7.89 ± 0.20^{Ba}	6.89 ± 0.22^{Ba}
	Oral	9.18 ± 0.15^{Aa}	7.45 ± 0.11^{Bb}	5.74 ± 0.18^{Cb}
	Gastric	6.32 ± 0.22^{Ab}	4.82 ± 0.18^{Bc}	5.03 ± 0.08^{Bc}
	Duodenum	6.02 ± 0.11^{Ab}	4.03 ± 0.07^{Bd}	4.58 ± 0.3^{Cc}
	Ileum	5.12 ± 0.12^{Ac}	3.76 ± 0.18^{Bd}	4.60 ± 0.3^{Cc}

*Immediately before exposure to simulated gastrointestinal digestion. JM: *L. fermentum* mix + freeze-dried jabuticaba peel; JFM: *L. fermentum* mix + freeze-dried jabuticaba peel + fructooligosaccharides.

Note: A–C: Different capital letters in the same row indicate difference at distinct storage times, based on Tukey's test ($p < 0.05$); a–d: For the same nutraceutical, different lowercase letters in the same column indicate difference between distinct digestion steps, based on Tukey's test ($p < 0.05$).

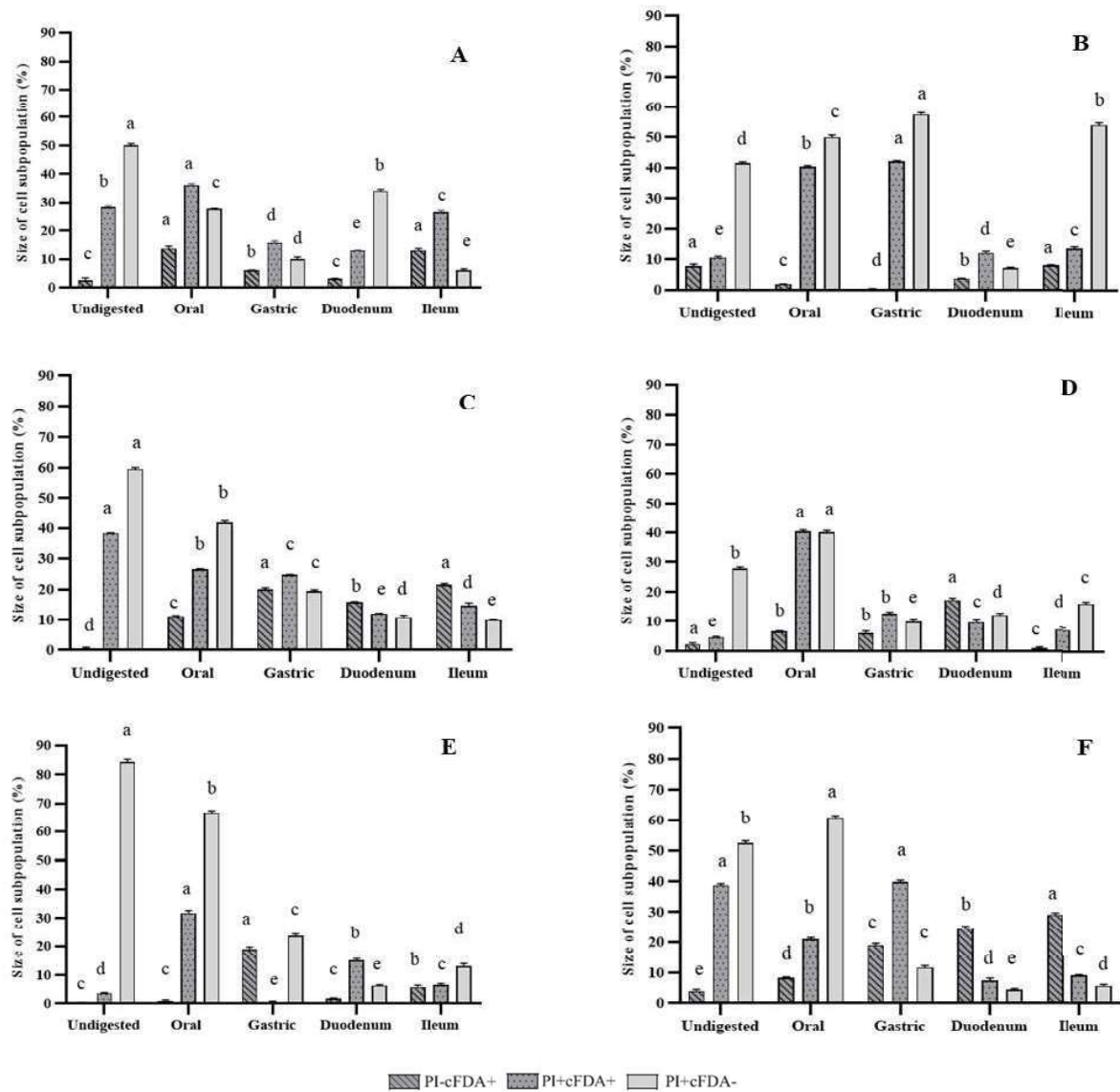


Figure 1. Physiological status of *Limosilactobacillus fermentum* cells in JM and JFM exposed to simulated gastrointestinal conditions. JM: *L. fermentum* mix + freeze-dried jabuticaba peel; JFM: *L. fermentum* mix + freeze-dried jabuticaba peel + fructooligosaccharides. A (JM, day zero), B (JM, 45 days), C (JM, 90 days), D (JFM, day zero), E (JFM, 45 days) and F (JFM, 90 days). Results are expressed as average $\pm$ standard deviation (n 3). a–d: different lowercase letters denote differences between distinct digestion steps, based on Tukey's test ($p \leq 0.05$)

Table 2. Content (mg/100g; average $\pm$ standard deviation, n = 3) of phenolic compounds in JM and JFM when exposed to simulated gastrointestinal digestion¹.

Nutraceutical/ Phenolic compound	Undigested*	Oral phase	Gastric phase	Duodenum phase	Ileum phase
		Day zero			
JM					
Gallic acid	3.0 ± 0.3 [#]	12.9 ± 1.1 ^{*,}	1.7 ± 0.2 ^{*,}	2.5 ± 0.0 ^{*,}	4.1 ± 0.2 ^{*,}
Ellagic acid	32.2 ± 3.2 [#]	206.1 ± 7.8 ^{*,}	21.8 ± 0.3 ^{*,}	27.0 ± 2.0 [#]	103.8 ± 4.9 ^{*,}
Cyanidin-3-O-glucoside	338.3 ± 3.4 [#]	<LOD	96.8 ± 1.1 ^{*,}	5.9 ± 0.3 ^{*,}	9.3 ± 0.3 [#]
JFM					
Gallic acid	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD
Ellagic acid	21.6 ± 0.4 [#]	36.8 ± 1.4 [#]	11.9 ± 0.8 ^{*,}	11.7 ± 1.1 [#]	41.1 ± 2.0 ^{*,}
Cyanidin-3-O-glucoside	260.6 ± 0.7 [#]	12.1 ± 0.6 ^{*,}	65.4 ± 6.4 ^{*,}	8.4 ± 0.8 ^{*,}	5.2 ± 0.3 [#]
Day 45					
JM					
Gallic acid	1.9 ± 0.2 [#]	6.5 ± 0.1 ^{*,}	<LOD	<LOD	13.5 ± 0.6 ^{*,}
Ellagic acid	36.0 ± 4.4 [#]	70.6 ± 9.0 ^{*,}	30.1 ± 1.2 ^{*,}	39.0 ± 3.3 [#]	140.4 ± 4.6 ^{*,}
Cyanidin-3-O-glucoside	439.5 ± 58.0 [#]	101.6 ± 7.5 ^{*,}	147.4 ± 9.9 ^{*,}	44.6 ± 4.2 ^{*,}	4.4 ± 0.4 ^{*,}
JFM					
Gallic acid	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD
Ellagic acid	10.6 ± 0.1 [#]	25.5 ± 0.8 ^{*,}	12.2 ± 0.5 ^{*,}	16.0 ± 1.8 [#]	18.5 ± 0.6 [#]
Cyanidin-3-O-glucoside	114.5 ± 1.1 [#]	35.5 ± 2.5 ^{*,}	56.0 ± 2.8 [#]	8.7 ± 2.0 ^{*,}	<LOD
Day 90					
JM					
Gallic acid	6.9 ± 0.8 [#]	9.8 ± 0.9 ^{*,}	4.3 ± 0.3 ^{*,}	6.0 ± 0.1 ^{*,}	<LOD
Ellagic acid	50.9 ± 0.9 [#]	104.6 ± 11.9 ^{*,}	39.9 ± 2.3 ^{*,}	51.8 ± 5.1 [#]	262.2 ± 9.8 ^{*,}
Cyanidin-3-O-glucoside	802.8 ± 64.8 [#]	255.9 ± 13.4 ^{*,}	278.2 ± 21.8 ^{*,}	148.3 ± 11.7 ^{*,}	1.9 ± 0.3 ^{*,}
JFM					
Gallic acid	4.0 ± 0.2 [#]	7.4 ± 0.2 ^{*,}	<LOD	2.7 ± 0.1 ^{*,}	8.4 ± 0.3 ^{*,}
Ellagic acid	19.4 ± 1.1 [#]	47.2 ± 1.3 ^{*,}	27.8 ± 2.6 ^{*,}	21.2 ± 0.1 [#]	47.9 ± 2.9 ^{*,}
Cyanidin-3-O-glucoside	81.0 ± 4.9 [#]	89.9 ± 3.0 [#]	107.1 ± 8.2 [#]	50.2 ± 0.1 ^{*,}	9.9 ± 1.1 ^{*,}

*Immediately before exposure to simulated gastrointestinal digestion. JM: *L. fermentum* mix + freeze-dried jabuticaba peel; JFM: *L. fermentum* mix + freeze-dried jabuticaba peel + fructooligosaccharides. The hashtag (#) indicates difference between JM and JFM in the same storage time (Unpaired t test, p < 0.05). The asterisk indicates difference in relation to the previous step (One-way ANOVA followed by Tukey's post-test, p < 0.05). <LOD: Below the limit of detection.

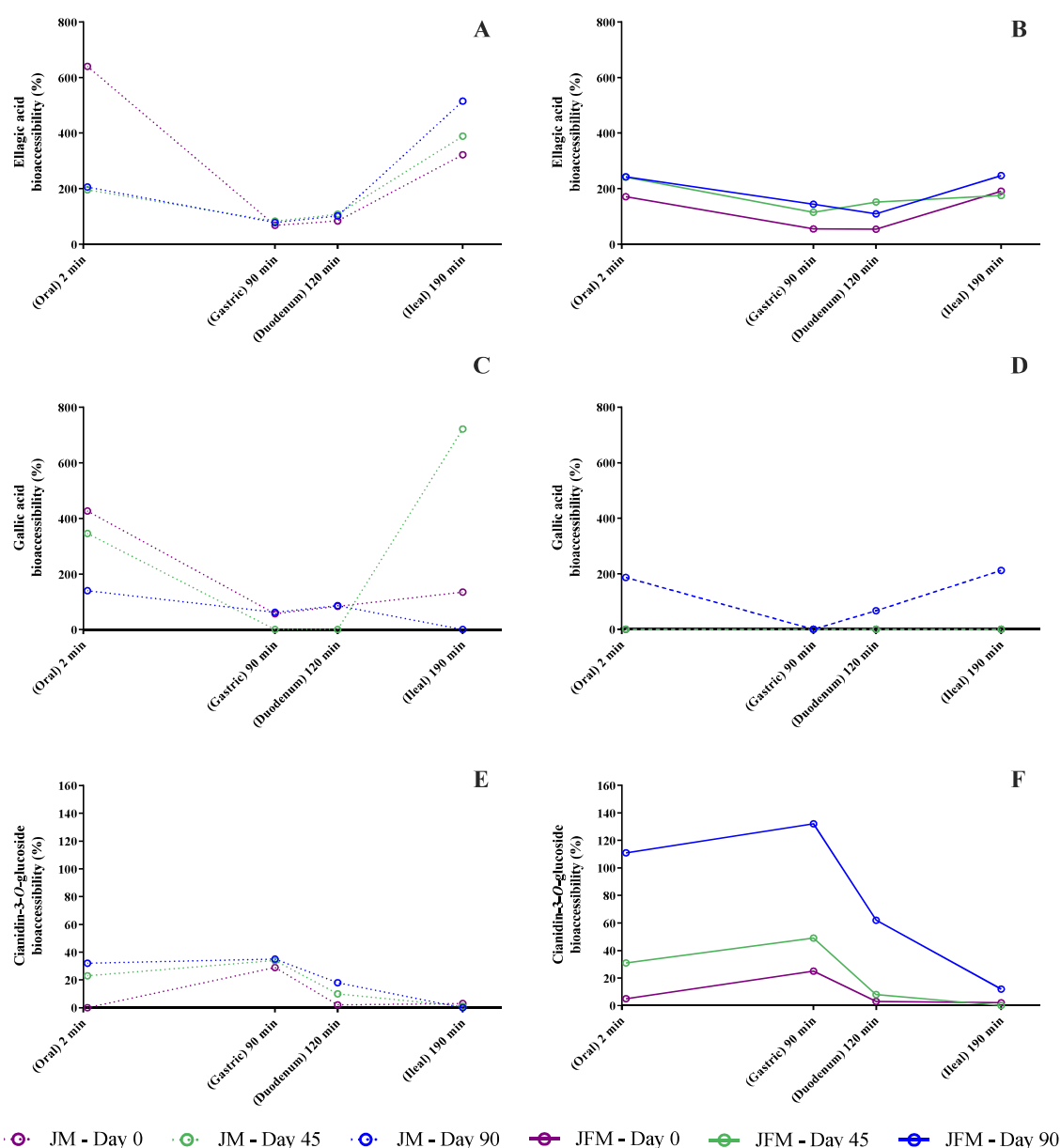


Figure 2. Bioaccessibility of ellagic acid (A and B), gallic acid (C and D), and cyanidin-3-O-glucoside (E and F) in JM and JFM, expressed as the percentage of compounds released during the simulated digestion concerning the content in the corresponding sample. JM: nutraceutical composed of freeze-dried jabuticaba peel and mixed culture of *Limosilactobacillus fermentum*; JFM: nutraceutical composed of freeze-dried jabuticaba peel fructooligosaccharides and culture of *L. fermentum*.

Table 3. Antioxidant activity (average $\pm$ standard deviation; $n = 3$) determined with ABTS, DPPH, and FRAP methods of JM and JFM on days zero, 45, and 90 of refrigerated storage (4 ± 0.5 °C) when exposed to simulated gastrointestinal digestion.

Nutraceuticals	Digestion step	Storage									
		Day zero	Day 45	Day 90	Day zero	Day 45	Day 90	Day zero	Day 45	Day 90	
JM	Undigested*	ABTS ⁺⁺ (μmol Trolox TEAC/g)			DPPH [*] (μmol Trolox TEAC/g)			FRAP (μmol FeSO ₄ /g)			
	Oral	12.76 ± 0.14 ^{Ab}	9.45 ± 0.42 ^{Bb}	8.23 ± 0.19 ^{Cb}	8.65 ± 0.25 ^{Aa}	7.28 ± 0.11 ^{Ba}	6.17 ± 0.09 ^{Ca}	70.31 ± 0.10 ^{Aa}	69.55 ± 0.48 ^{Ba}	67.23 ± 0.05 ^{Ca}	
	Gastric	12.13 ± 0.09 ^{Ac}	8.79 ± 0.17 ^{Bc}	7.74 ± 0.19 ^{Cb}	7.28 ± 0.05 ^{Ab}	6.01 ± 0.02 ^{Bc}	5.30 ± 0.10 ^{Ca}	68.38 ± 0.17 ^{Ac}	66.88 ± 0.14 ^{Bb}	65.43 ± 0.06 ^{Cc}	
	Duodenum	16.19 ± 0.16 ^{Aa}	12.86 ± 0.17 ^{Ba}	11.74 ± 0.24 ^{Ca}	7.30 ± 0.10 ^{Ab}	6.84 ± 0.06 ^{Bb}	5.77 ± 0.06 ^{Ca}	69.09 ± 0.11 ^{Ab}	67.32 ± 0.29 ^{Bb}	66.08 ± 0.08 ^{Cb}	
	Ileum	11.10 ± 0.09 ^{Ad}	7.70 ± 0.18 ^{Bd}	6.58 ± 0.11 ^{Cc}	6.75 ± 0.11 ^{Ac}	5.77 ± 0.03 ^{Bc}	4.11 ± 0.03 ^{Cb}	67.05 ± 0.06 ^{Ad}	65.29 ± 0.10 ^{Bc}	64.07 ± 0.11 ^{Cd}	
	Ileum	11.16 ± 0.11 ^{Ad}	8.03 ± 0.07 ^{Bd}	6.37 ± 0.17 ^{Cc}	6.59 ± 0.12 ^{Ac}	5.43 ± 0.22 ^{Bd}	4.02 ± 0.04 ^{Cb}	66.96 ± 0.06 ^{Ad}	64.76 ± 0.06 ^{Bc}	63.66 ± 0.09 ^{Cc}	
JFM	Undigested*	13.21 ± 0.31 ^{Ab}	10.18 ± 0.26 ^{Bb}	9.60 ± 0.10 ^{Bb}	9.58 ± 0.04 ^{Aa}	8.48 ± 0.26 ^{Ba}	6.25 ± 0.14 ^{Ca}	71.30 ± 0.63 ^{Ab}	69.98 ± 0.17 ^{Bb}	68.31 ± 0.58 ^{Cb}	
	Oral	12.50 ± 0.24 ^{Ab}	9.68 ± 0.17 ^{Bb}	8.99 ± 0.03 ^{Cc}	8.50 ± 0.02 ^{Ab}	6.40 ± 0.07 ^{Bb}	4.88 ± 0.10 ^{Cb}	69.25 ± 0.33 ^{Ac}	68.43 ± 0.41 ^{Bc}	67.18 ± 0.20 ^{Cb}	
	Gastric	16.75 ± 0.21 ^{Aa}	13.38 ± 0.36 ^{Ba}	13.13 ± 0.16 ^{Ba}	8.75 ± 0.12 ^{Ab}	6.70 ± 0.13 ^{Bb}	5.09 ± 0.05 ^{Cb}	74.09 ± 0.09 ^{Aa}	72.53 ± 0.57 ^{Ba}	72.32 ± 0.68 ^{Ba}	
	Duodenum	11.82 ± 0.24 ^{Ac}	8.70 ± 0.20 ^{Bc}	7.94 ± 0.08 ^{Cd}	5.21 ± 0.03 ^{Ac}	5.19 ± 0.05 ^{Bc}	3.90 ± 0.05 ^{Cc}	62.39 ± 0.52 ^{Ad}	61.92 ± 0.14 ^{Ad}	60.79 ± 0.22 ^{Bc}	
	Ileum	11.81 ± 0.33 ^{Ac}	8.28 ± 0.17 ^{Bc}	7.96 ± 0.06 ^{Bd}	7.86 ± 0.17 ^{Ac}	5.02 ± 0.07 ^{Bc}	3.70 ± 0.17 ^{Cc}	59.02 ± 0.28 ^{Ae}	57.80 ± 0.51 ^{Be}	56.45 ± 0.49 ^{Cd}	
	Ileum	11.81 ± 0.33 ^{Ac}	8.28 ± 0.17 ^{Bc}	7.96 ± 0.06 ^{Bd}	7.86 ± 0.17 ^{Ac}	5.02 ± 0.07 ^{Bc}	3.70 ± 0.17 ^{Cc}	59.02 ± 0.28 ^{Ae}	57.80 ± 0.51 ^{Be}	56.45 ± 0.49 ^{Cd}	

*Immediately before exposure to simulated gastrointestinal digestion. JM: *L. fermentum* mix + freeze-dried jabuticaba peel; JFM: *L. fermentum* mix + freeze-dried jabuticaba peel + fructooligosaccharides. Note: A–C: For the same nutraceutical and method, different capital letters in the same column indicate difference, based on Tukey's test ($p < 0.05$); a–e: For the same nutraceutical and method, different lowercase letters in the same column indicate difference, based on Tukey's test ($p < 0.05$). Abbreviations: ABTS⁺⁺ cation - 2,2-azino-bis (3-ethylbenzotiazoline)-6-sulfonic acid; DPPH[•], 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl; FRAP, ferric-reducing ability of plasma; FeSO₄, ferrous sulfate.

758

759

760

761

762

763

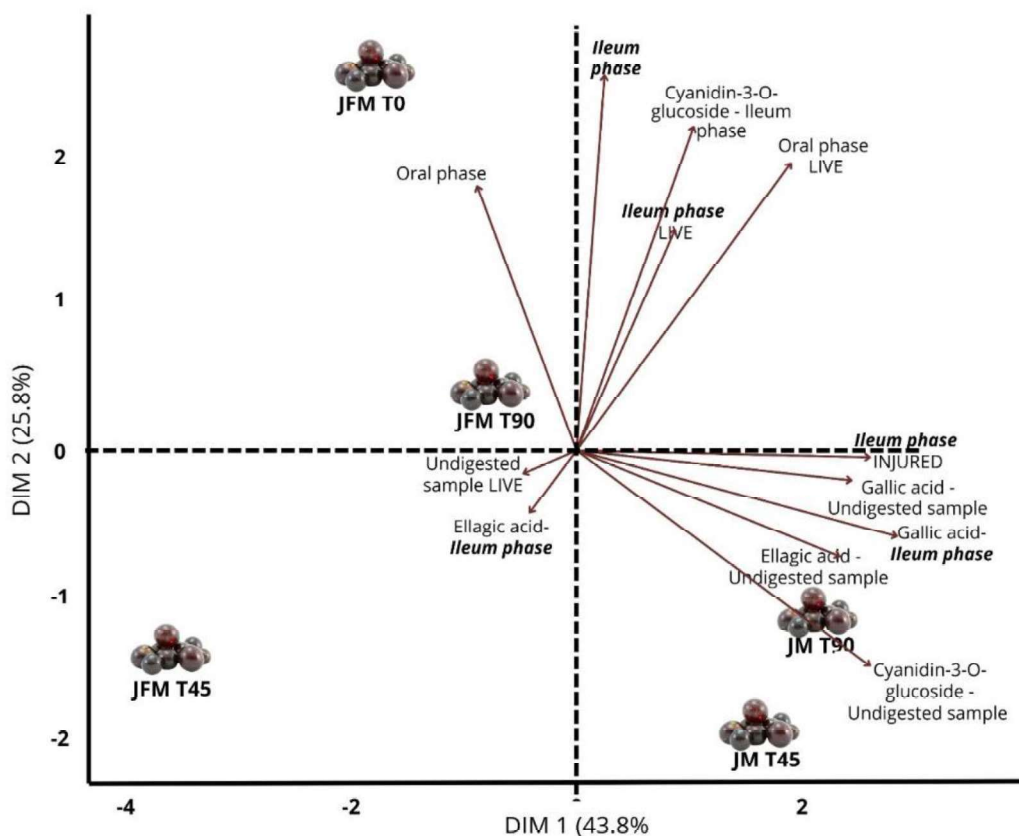


Figure 3. Principal component analysis (PCA) considering variables measured in JM and JFM on days zero, 45, and 90 of refrigerated storage (4 ± 0.5 °C) when exposed to simulated gastrointestinal digestion. Variables: physiological state of *Limosilactobacillus fermentum* cells, antioxidant activity, and contents of phenolic compounds.

