

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

CAROLINY MESQUITA ARAÚJO

**POTENCIAL DE COPRODUTOS DE FRUTAS TROPICAIS COMO
RECURSOS CIRCULARES PARA PROMOVER A VIABILIDADE
PROBIÓTICA DE *Lactobacillus* EM BIOPROCESSAMENTOS E A
MODULAÇÃO DA MICROBIOTA INTESTINAL**

João Pessoa

2024

CAROLINY MESQUITA ARAÚJO

**POTENCIAL DE COPRODUTOS DE FRUTAS TROPICAIS COMO RECURSOS
CIRCULARES PARA PROMOVER A VIABILIDADE PROBIÓTICA DE
Lactobacillus EM BIOPROCESSAMENTOS E A MODULAÇÃO DA MICROBIOTA
INTESTINAL**

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

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

João Pessoa

2024

Catálogo na publicação
Seção de Catalogação e Classificação

A663p Araújo, Carolyn Mesquita.

Potencial de coprodutos de frutas tropicais como recursos circulares para promover a viabilidade probiótica de *Lactobacillus* em bioprocessamentos e a modulação da microbiota intestinal / Carolyn Mesquita Araújo. - João Pessoa, 2024.

174 f. : il.

Orientação: Maria Elieidy Gomes de Oliveira.
Tese (Doutorado) - UFPB/CCS.

1. Frutas tropicais - Coprodutos. 2. Coprodutos de frutas - Fermentação. 3. Coprodutos fermentados - *Lactobacillus*. 4. Microbiota intestinal. 5. Cepas prebióticas. 6. Cepas probióticas. I. Oliveira, Maria Elieidy Gomes de. II. Título.

UFPB/BC

CDU 634.6(043)

CAROLINY MESQUITA ARAÚJO

**Potencial de coprodutos de frutas tropicais como recursos circulares para promover a
viabilidade probiótica de *Lactobacillus* em bioprocessamentos e a modulação da
microbiota intestinal**

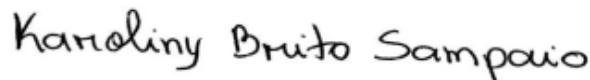
Tese defendida em 28/03/2024

BANCA EXAMINADORA



Profa. Dra. Maria Elieidy Gomes de Oliveira
Orientadora (DN/CCS/UFPB)

Profa. Dra. Estefânia Fernandes Garcia
Examinador Interno Titular (CTDR/UFPB)



Profa. Dra. Karoliny Brito Sampaio
Examinador Externo Titular (CTDR/UFPB)

Profa. Dra. Jossana Pereira de Sousa Guedes
Examinador Externo Titular (CAVN/CCHSA/UFPB)

Profa. Dra. Vanessa Bordin Vieira
Examinador Externo Titular (CES/UFCG)

Profa. Dr. Evandro Leite de Souza
Examinador Interno Suplente (DN/CCS/UFPB)

Profa. Dr. Yuri Manguiera
Examinador Externo Suplente (LMCA/IPeFarM/UFPB)

Dedico este trabalho a Deus, que me deu força em todos os momentos, principalmente nos mais difíceis. A minha filha Manuella, minha fonte de inspiração

Dedico

AGRADECIMENTOS

A Deus, pela minha vida. Agradeço por ter me dado forças nos momentos mais difíceis, onde minha fé só aumenta; pelas bênçãos sem fim, pelas alegrias, conquistas e por tudo. A minha filha, Manuella, minha fonte diária de inspiração para continuar nessa caminhada, obrigada filha. Aos meus pais, Everson Rafael e Maria Ivaneide, pelo apoio e força em todos os momentos, pelas orações, pelos sorrisos e todos os gestos de amor que vocês me transmitem, obrigada por tudo. Ao meu irmão, Caio Vinícius, que sempre me ajudou e incentivou em todos os momentos a seguir os meus sonhos e nunca desistir. Ao meu esposo, Tony Lira, pelo carinho e compreensão; pelos momentos de companheirismo, não me deixando desacreditar diante das dificuldades. A minha querida cunhada, Jordana, por todo carinho e amizade de sempre.

Ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Nutrição/UFPB, em especial ao corpo docente, pela oportunidade e atenção no decorrer do curso de doutorado. Em especial a minha orientadora, Maria Elieidy, pela sua paciência, apoio, amor e carinho em todos os momentos, pela mão amiga e pela sua cumplicidade de sempre. Ao professor Dr. Evandro Leite de Souza, que abriu as portas do Laboratório de Microbiologia e Bioquímica de Alimentos, para realização deste estudo, pela disponibilidade da estrutura física e corpo técnico e também por seus preciosos ensinamentos e considerações/correções essenciais para a melhoria dos manuscritos. A professora e amiga Thatyane Mariano, pelo incentivo, apoio e execução de ensaios laboratoriais e na escrita dos manuscritos, muito obrigada amiga, você foi fundamental para a conclusão do meu doutorado.

Ao Laboratório de Microbiologia e Bioquímica de Alimentos que possibilitou a execução da pesquisa, como também à Prof^a. Dr^a. Maria Lúcia da Conceição, pelo carinho, acolhimento e todos os ensinamentos no laboratório. Agradeço a todos os amigos que me acompanharam ao longo desses anos e foram essenciais para o desenvolvimento dessa pesquisa, Maiara Lima, Jaielison Yandro e Jordana Nunes. A professora Dra. Karoliny Sampaio, por toda ajuda nas análises como também na escrita dos manuscritos, obrigada amiga. Ao professor Yuri Manguiera e a equipe do IPeFarM, pelas análises de ressonância e cromatográficas, respectivamente. Ao professor Dr. Marcos dos Santos Lima, pelas análises de ressonância condução das análises cromatográficas. Ao secretário da Pós-Graduação, Carlos Fernando, em atender aos meus pedidos e responder as minhas dúvidas. A todos que de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho, aqui ficam os meus sinceros agradecimentos.

RESUMO

As frutas são amplamente conhecidas pelo seu valor nutricional e potencial funcional, e recentemente, os coprodutos de frutas tem ganhado destaque especial devido a sua riqueza em compostos bioativos. Esses coprodutos são derivados da indústria de processamento de frutas, constituídos basicamente de cascas, sementes e talos, geralmente são descartados. Este estudo teve por objetivo avaliar o potencial de utilização de coprodutos do processamento de frutas, acerola (*Malpighia glabra* L., CACE), caju (*Anacardium occidentale* L., CCAS) e goiaba (*Psidium guajaba* L., CGUA) como meios para multiplicação (fermentação) e manutenção da viabilidade de *Lactobacillus acidophilus* LA-05 e *Lacticaseibacillus paracasei* L-10 durante a liofilização, armazenamento e digestão gastrointestinal simulada, como também os efeitos na abundância relativa de diferentes grupos bacterianos intestinais, metabolismo microbiano e capacidade antioxidante durante 48 h de fermentação fecal usando inóculo fecal humano. Os resultados mostraram que, quando utilizados como meios de cultivo, CACE, CCAS e CGUA resultaram em contagem de células viáveis de *Lactobacillus* $\geq 8,8$ log UFC/g após 24 h, além de capacidade de redução da fase *lag*. Ao longo da fermentação, houve redução na concentração dos açúcares glicose e frutose, com concomitante aumento na produção de ácidos orgânicos, e redução do pH (3.46 – 3.99). A fermentação dos coprodutos por *Lactobacillus* promoveu aumento na concentração de compostos fenólicos, que contribuiu para o aumento da atividade antioxidante ao final do processo fermentativo. Após o processo de liofilização das cepas de *Lactobacillus* nos coprodutos fermentados, observaram-se altas taxas de sobrevivência (> 86%), demonstrando que esses meios poderiam proteger as cepas durante a liofilização. Ao final do armazenamento, *L. acidophilus* LA-05 e *L. paracasei* L-10 liofilizados com CACE, CCAS e CGUA apresentaram reduções (2-3 ciclos logarítmicos) $p < 0,05$ menores que quando liofilizados no meio controle. Ainda, CACE, CCAS e CGUA foram capazes de reduzir o tamanho de subpopulações injuriadas e mortas durante as etapas da digestão simulada. Os meios dos coprodutos de frutas aumentaram a abundância relativa de grupos bacterianos benéficos, ao mesmo tempo que diminuíram ou mantiveram a abundância relativa de grupos bacterianos não benéficos, indicando efeitos estimuladores supostamente seletivos nas populações intestinais bacterianas benéficas. Concomitante a isso, houve estímulo da atividade microbiana, com alteração do perfil metabólico, resultando em diminuição do pH, consumo de açúcar, produção de ácidos graxos de cadeia curta, aumento de compostos fenólicos e da capacidade antioxidante durante a fermentação fecal. Esses resultados sugerem que CACE, CCAS e CGUA podem atuar como meios de cultivo eficientes para crescimento de *L. acidophilus* LA-05 e *L. paracasei* L-10, com efeito protetor destas cepas durante liofilização, armazenamento e exposição à digestão gastrointestinal simulada. Além disso, podem induzir mudanças benéficas na abundância relativa de vários grupos bacterianos, bem como na atividade metabólica da microbiota intestinal humana, sendo candidatos circulares novos e sustentáveis para uso como ingredientes simbióticos.

Palavras-chave: Coprodutos de frutas; probióticos; prebióticos; fermentação; microbiota intestinal; ingrediente funcional.

ABSTRACT

Fruits are widely known for their nutritional value and functional potential, and recently, fruit co-products have gained special attention due to their richness in bioactive compounds. These co-products are derived from the fruit processing industry, basically consisting of peels, seeds and stalks, and are generally discarded. This study aimed to evaluate the potential for using co-products from fruit processing, acerola (*Malpighia glabra* L., CACE), cashew (*Anacardium occidentale* L., CCAS) and guava (*Psidium guayaba* L., CGUA) as means for multiplication (fermentation) and maintenance of viability of *Lactobacillus acidophilus* LA-05 and *Lactocaseibacillus paracasei* L-10 during freeze-drying, storage and simulated gastrointestinal digestion, as well as the effects on the relative abundance of different intestinal bacterial groups, microbial metabolism and antioxidant capacity during 48 h of fecal fermentation using human fecal inoculum. The results showed that, when used as culture media, CACE, CCAS and CGUA resulted in viable *Lactobacillus* cell counts ≥ 8.8 log CFU/g after 24 h, in addition to the ability to reduce the lag phase. Throughout fermentation, there was a reduction in the concentration of glucose and fructose sugars, with a concomitant increase in the production of organic acids, and a reduction in pH (3.46 – 3.99). The fermentation of co-products by *Lactobacillus* promoted an increase in the concentration of phenolic compounds, which contributed to an increase in antioxidant activity at the end of the fermentation process. After the freeze-drying process of *Lactobacillus* strains in the fermented co-products, high survival rates ($> 86\%$) were observed, demonstrating that these media could protect the strains during freeze-drying. At the end of storage, *L. acidophilus* LA-05 and *L. paracasei* L-10 lyophilized with CACE, CCAS and CGUA showed reductions (2-3 logarithmic cycles) $p < 0.05$ smaller than when lyophilized in the control medium. Furthermore, CACE, CCAS and CGUA were able to reduce the size of injured and dead subpopulations during the simulated digestion steps. Fruit coproduct media increased the relative abundance of beneficial bacterial groups while decreasing or maintaining the relative abundance of non-beneficial bacterial groups, indicating putatively selective stimulatory effects on beneficial intestinal bacterial populations. Concomitant to this, there was a stimulation of microbial activity, with a change in the metabolic profile, resulting in a decrease in pH, sugar consumption, production of short-chain fatty acids, an increase in phenolic compounds and antioxidant capacity during fecal fermentation. These results suggest that CACE, CCAS and CGUA can act as efficient culture media for the growth of *L. acidophilus* LA-05 and *L. paracasei* L-10, with a protective effect on these strains during freeze-drying, storage and exposure to simulated gastrointestinal digestion. Furthermore, they can induce beneficial changes in the relative abundance of various bacterial groups, as well as in the metabolic activity of the human intestinal microbiota, making them new and sustainable circular candidates for use as symbiotic ingredients.

Keywords: Fruit co-products; probiotics; prebiotics; fermentation; intestinal microbiota; functional ingredient.

LISTA DE TABELAS

TABELAS DA TESE

Tabela 1: Suspensões utilizadas para a fermentação fecal.....	50
Tabela 2: Sondas de oligonucleotídeos de rRNA 16S e condições de hibridização utilizadas nas análises com hibridização <i>in situ</i> fluorescente acoplada a citometria de fluxo.....	53

TABELAS DO APÊNDICE B - ARTIGO I

Table 1. Centesimal composition and water activity (Mean $\pm$ standard deviation, n = 3) of freeze-dried acerola (<i>Malpighia glabra</i> L., CACE), cashew (<i>Anacardium occidentale</i> L., CCAS), and guava (<i>Psidium guajava</i> L., CGUA) coproducts.....	117
Table 2. Kinetic microorganism's growth parameters in different medium with fruits coproducts of acerola (<i>Malpighia glabra</i> L., CACE), cashew apple (<i>Anacardium occidentale</i> L., CCAS), guava (<i>Psidium guajava</i> L., CGUA), or control (De Man, Rogosa e Sharpe, MRS).....	118
Table 3. Sugars and acids contents (g/L) during fermentation in medium with fruits coproducts of acerola (<i>Malpighia glabra</i> L., CACE), cashew (<i>Anacardium occidentale</i> L., CCAS), guava (<i>Psidium guajava</i> L., CGUA), or control (De Man, Rogosa e Sharpe, MRS) at 0, 12 and 20 h of fermentation.....	119
Table 4. Phenolic compounds contents (mg/L) during fermentation in fruit coproduct growing medium of acerola (<i>Malpighia glabra</i> L., CACE), cashew (<i>Anacardium occidentale</i> L., CCAS), or guava (<i>Psidium guajava</i> L., CGUA) at 0 and 20 h of fermentation.....	120
Table 5. Activity antioxidant during fermentation in fruit coproduct growing medium of acerola (<i>Malpighia glabra</i> L., CACE), cashew (<i>Anacardium occidentale</i> L., CCAS), guava (<i>Psidium guajava</i> L., CGUA), or control (De Man, Rogosa e Sharpe, MRS) at 0 and 20 h of fermentation.....	121
Table 6. Fiber contents (%) during fermentation in fruit coproduct growing medium of acerola (<i>Malpighia glabra</i> L., CACE), cashew (<i>Anacardium occidentale</i> L., CCAS), or guava (<i>Psidium guajava</i> L., CGUA) at 0 and 20 h of fermentation.....	122
Table 7. Viable cell counts (log CFU/mL) of <i>L. acidophilus</i> LA-05 and <i>L. paracasei</i> L-10 before and after freeze-drying in fruit coproduct growing medium of acerola (<i>Malpighia glabra</i> L., CACE), cashew (<i>Anacardium occidentale</i> L., CCAS), guava (<i>Psidium guajava</i> L., CGUA), or control (De Man, Rogosa e Sharpe, MRS).....	123

TABELAS DO APÊNDICE C - ARTIGO II

Table 1. Relative abundance (% average $\pm$ standard deviation; n = 3) of different intestinal bacterial groups in media with fermented acerola and guava fruit by-products digested (AL10, ALA5, GL10, and GLA5) and fructooligosaccharides (FOS), as well as in negative control (NC; without fermentable substrate) at zero, 24, and 48 h of <i>in vitro</i> colonic fermentation.	164
Table 2. pH values, contents of sugars, lactic acid, and short-chain fatty acids (SCFA) (g/L) in media with fermented acerola and guava fruit by-products (AL10, ALA5, GL10, and GLA5), fructooligosaccharides (FOS), as well as in negative control (NC; without fermentable substrate) at time zero (baseline), 24, and 48 h of <i>in vitro</i> colonic fermentation..	165
Table 3. Contents of phenolic compounds (mg/L) and antioxidant capacity (%) (average $\pm$ standard deviation; n = 3) in media with fermented acerola and guava fruit by-products (AL10, ALA5, GL10, and GLA5) and fructooligosaccharides (FOS), as well as in negative control (NC; without fermentable substrate) at time zero (baseline), 24, and 48 h of <i>in vitro</i> colonic fermentation.....	167
Table S1. Physicochemical parameters of freeze-dried fruit processing co-products used in assays to evaluate potential prebiotic properties (Araújo et al., 2020).....	169
Table S2. Identification of metabolites by ^1H -NMR in media with fermented acerola and guava fruit co-products (AL10, ALA5, GL10, and GLA5) and fructooligosaccharides (FOS), as well as in negative control (NC; without fermentable substrate) at time zero (baseline), and 48 h of <i>in vitro</i> colonic fermentation.....	170

LISTA DE FIGURAS

LISTA DE FIGURAS DA TESE

Figura 1. Modelo de economia circular de coprodutos agroindustriais de frutas.....	20
Figura 2. A: Acerola (<i>Malpighia glabra</i> L.); B: Coproduto do processamento da acerola...	23
Figura 3. A: Caju (<i>Anacardium occidentale</i> L.); B: Coproduto do processamento do caju..	25
Figura 4. A: Goiaba (<i>Psidium guajava</i> L.); B: Coproduto do processamento da goiaba.....	27
Figura 5. Fatores que podem influenciar na viabilidade das cepas probióticas.....	30
Figura 6. Delineamento experimental do primeiro artigo da tese.....	35
Figura 7. Delineamento experimental do segundo artigo da tese.....	36
Figura 8. Coprodutos de frutas tropicais liofilizados de acerola (A), caju (B) e goiaba (C), respectivamente.....	37

LISTA DE FIGURAS DO APÊNDICE B - ARTIGO I

Figure 1. Growth kinetics (average $\pm$ standard deviation, n: 3) of <i>Lactobacillus acidophilus</i> LA-05 (A, C) and <i>Lactocaseibacillus paracasei</i> L-10 (B, D) in the growing medium MRS (De Man, Rogosa, and Sharpe, control [□]), and coproducts of acerola (<i>Malpighia glabra</i> L. [▲]), cashew (<i>Anacardium occidentale</i> L. [■]), or guava (<i>Psidium guajava</i> L. [●]), for 24 h of fermentation.....	111
Figure 2. PCA dos coprodutos de acerola, caju e goiaba com base em integrais de binnings de espectros de ^1H NMR. (A) – Score plot; (B) – Loadings plot.....	112
Figure 3. HCA dos coprodutos de acerola, caju e goiaba com base em integrais de binnings de espectros de ^1H NMR.....	113
Figure 4. Viable cell counts (log CFU/g, average $\pm$ standard deviation, n: 3) of <i>Lactobacillus acidophilus</i> LA-05 (A) and <i>Lactocaseibacillus paracasei</i> L-10 (B) after freeze-dried in fruit coproduct growing medium of acerola (<i>Malpighia glabra</i> L., CACE [▲]), cashew (<i>Anacardium occidentale</i> L., CCAS [■]), guava (<i>Psidium guajava</i> L., CGUA [●]), or control [□], during 120 days of refrigerated storage.....	114
Figure 5. Viable cell counts (log CFU/g, mean $\pm$ standard deviation, n: 3) of freeze-dried <i>Lactobacillus acidophilus</i> LA-05 (A; B) and <i>Lactocaseibacillus paracasei</i> L-10 (C; D) in	

fruit coproduct growing medium of acerola (*Malpighia glabra* L., CACE [▲]), cashew (*Anacardium occidentale* L., CCAS [■]), guava (*Psidium guajava* L., CGUA [●]), or control [□], during simulated gastrointestinal digestion at day 1 (A; C) and 120 days (B; D) of refrigerated storage (4 °C)..... 115

Figure 6. Size of cell subpopulations of freeze-dried *Lactobacillus acidophilus* LA-05 (A; B) and *Lactocaseibacillus paracasei* L-10 (C; D) in fruit coproduct growing medium of acerola (*Malpighia glabra* L., CACE), cashew (*Anacardium occidentale* L., CCAS), guava (*Psidium guajava* L., CGUA), or in control, during simulated gastrointestinal digestion at day 1 (A; C) and 120 days (B; D) of refrigerated storage (4 °C). F: freeze-drying; M: mouth; phase; G: gastric phase; I: intestinal phase..... 116

LISTA DE FIGURAS DO APÊNDICE C - ARTIGO II

Figure 1. Representative ¹H NMR spectra of the media with fermented acerola and guava fruit by-products digested at time 0 and 48 h of *in vitro* fecal fermentation analyzed by ¹H NMR. 1: biliary salts; 2: 2-methylbutyrate; 3: valerate; 4: n-butyrate; 5: leucine; 6: isoleucine; 7: valine; 8: propionate/propionic acid; 9: isobutyrate/butyric acid; 10: 3-methyl-2-oxoisovalerate; 11: 2-oxoisovalerate; 12: ethanol; 13: 3-hydroxybutyrate; 14: threonine; 15: lactate/lactic acid; 16: alanine; 17: lysine; 18: ornithine; 19: acetate/acetic acid; 20: proline; 21: glutamate; 22: 5-aminopentanoate; 23: succinate/succinic acid; 24: methylamine; 25: methionine; 26: citrate/citric acid; 27: aspartate; 28: asparagine; 29: trimethylamine; 30: putrescine; 31: malonate; 32: glycine; 33: fructose; 34: dihydroxyacetone; 35: α-xylose; 36: β-xylose; 37: β-glucose; 38: α-glucose; 39: β-galactose; 40: UDP-glucuronate; 41: homovanillate; 42: 3-hydroxyphenylacetate; 43: p-cresol; 44: tyrosine; 45: 5-aminosalicylate; 46: phenylalanine; 47: uracil; 48: N-acetyl-5-aminosalicylate; 49: phenylacetate; 50: tryptophan; 51: hypoxanthine; 52: formate/formic acid; 53: caprylate; 54: isocaproate; 55: isovalerate; 56: 3-hydroxyisovalerate; 57: total lipids; 58: gamma-aminobutyric acid (GABA); 59: ketoisovalerate; 60: acetone..... 161

Figure 2. (A) Principal Component Analysis (PCA) run for in media with fermented acerola and guava fruit by-products (AL10, ALA5, GL10, and GLA5), fructooligosaccharides (FOS), as well as in negative control (NC; without fermentable substrate) at time zero (baseline), 24, and 48 h of *in vitro* fecal fermentation (variables: relative abundance of distinct bacterial groups, contents of sugars and organic acids, and values of pH, and antioxidant activity). (B): Heat map with correlation coefficients indicates the associations between the relative abundance of distinct bacterial groups, contents of sugars and organic acids, and values of pH, , and antioxidant capacity..... 163

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

a _a	Atividade de Água
ABTS	2,2-azinobis (3-etilbenzotiazolina-6-ácido sulfônico)
ANOVA	Análise de variância
AOAC	Association of Official Agricultural Chemists
BAL	Bactéria ácido láctica
°C	Graus Celsius
CaCl ₂	Cloreto de cálcio
CF	Citometria de Fluxo
CLAE	Cromatografia líquida de alta eficiência
CMRS	Caldo de Mann, Rogosa e Sharpe
DO	Densidade Óptica
DPPH	2,2-difenil-1-picril-hidrazil
FAO	Food and Agriculture Organization
FOS	Fruto-oligosacarídeos
FRAP	Ferric Reducing antioxidant power
GOS	Galacto-oligosacarídeos
HCl	Ácido clorídrico
IP	Iodeto de propídio
LA-05	<i>Lactobacillus acidophilus</i>
L-10	<i>Lactocaseibacillus paracasei</i>
Na ₂ CO ₃	Carbonato de sódio
NaHCO ₃	Bicarbonato de sódio
NaOH	Hidróxido de sódio
OMS	Organização Mundial de Saúde
PBS	Solução salina tamponada com fosfato
pH	Potencial hidrogeniônico
RID	Refractive Index Detector

RMN	Ressonância Magnética Nuclear
RPM	Rotação por minuto
TGI	Trato gastrointestinal
Tg	Temperatura de transição vítrea
UFC	Unidade de formadora de colônia

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	17
2 REFERENCIAL TEÓRICO.....	19
2.1 FRUTAS E COPRODUTOS DO PROCESSAMENTO DE FRUTAS.....	19
2.1.1 Acerola (<i>Malpighia glabra</i> L.).....	22
2.1.2 Caju (<i>Anacardium occidentale</i> L.)	24
2.1.3 Goiaba (<i>Psidium guajava</i> L.).....	26
2.2 MICROBIOTA INTESTINAL, PROBIÓTICOS E PREBIÓTICOS.....	28
2.2.1 Obtenção industrial de cepas probióticas.....	29
3 MATERIAL E MÉTODOS.....	35
3.1 LOCAL DE EXECUÇÃO DA PESQUISA E DELINEAMENTO EXPERIMENTAL...	35
3.2 OBTENÇÃO E PREPARAÇÃO DOS COPRODUTOS DE FRUTAS.....	36
3.3 CARACTERIZAÇÃO DOS COPRODUTOS DE FRUTAS LIOFILIZADOS.....	37
3.3.1 Atividade de água e Composição centesimal.....	37
3.4 ENSAIOS DA UTILIZAÇÃO DOS COPRODUTOS COMO MEIO DE CULTIVO....	37
3.4.1 Microrganismos, preparação dos meios de cultivo, condições e cinética de crescimento.....	38
3.4.2 Avaliação da atividade metabólica bacteriana durante fermentação.....	39
3.4.2.1 <i>Determinação dos açúcares, ácidos orgânicos e compostos fenólicos.....</i>	<i>39</i>
3.4.2.2 <i>Determinação do conteúdo de fibras.....</i>	<i>40</i>
3.4.2.3 <i>Determinação da atividade antioxidante.....</i>	<i>42</i>
3.4.2.4 <i>Perfil metabólico global.....</i>	<i>45</i>
3.5 AVALIAÇÃO DOS COPRODUTOS FERMENTADOS COM PROBIÓTICOS.....	45
3.5.1 Viabilidade das cepas probióticas após liofilização e durante o armazenamento.....	45
3.5.2 Viabilidade das cepas probióticas durante a digestão gastrointestinal simulada....	46
3.5.3 Avaliação do estado fisiológico da célula bacteriana após a liofilização e durante a digestão gastrointestinal simulada.....	47
3.5.3.1 <i>Procedimento de coloração</i>	<i>47</i>
3.5.3.2 <i>Análises em citometria de fluxo</i>	<i>48</i>

3.5.3.3 Interpretação dos resultados	48
3.6 FERMENTAÇÃO FECAL <i>IN VITRO</i> DOS COPRODUTOS FERMENTADOS COM PROBIÓTICOS.....	49
3.6.1 Aspectos éticos da pesquisa.....	49
3.6.2 Coleta das amostras fecais.....	49
3.6.3 Simulação da digestão gastrointestinal.....	50
3.6.4 Preparação do inóculo fecal e do meio de fermentação fecal <i>in vitro</i>	50
3.6.5 Quantificação das populações bacterianas nos sistemas de fermentação fecal com hibridização por fluorescência <i>in situ</i> (FISH) e citometria de fluxo (CF).....	51
3.6.6 Determinação do metabolismo microbiano durante a fermentação fecal <i>in vitro</i>	53
3.6.7 Determinação da capacidade antioxidante durante a fermentação fecal <i>in vitro</i>	54
3.7 ANÁLISES ESTATÍSTICAS.....	54
4 RESULTADOS	55
REFERÊNCIAS.....	57
APÊNDICES.....	74
APÊNDICE A – TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO.....	75
APÊNDICE B – ARTIGO I.....	77
APÊNDICE C – ARTIGO II.....	124
ANEXOS.....	173
ANEXO A – CERTIDÃO DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA.....	173

1 INTRODUÇÃO

As frutas desempenham um papel fundamental na nutrição humana, portanto, a demanda por esses produtos aumentou significativamente como resultado do crescimento da população global e da mudança nos hábitos alimentares (Cádiz-Gurrea *et al.*, 2020). O Brasil é o terceiro maior produtor de frutas do mundo, produzindo e processando uma elevada quantidade de frutas tropicais, como acerola, caju e goiaba (Albuquerque *et al.*, 2019; Sabino *et al.*, 2020). Cerca de 53% da produção nacional de frutas é destinado para as indústrias de processamento, com isso são produzidas grandes quantidades de coprodutos de frutas que representam um importante problema ambiental (Araújo *et al.*, 2014).

Os coprodutos do processamento de frutas são constituídos de cascas, sementes, bagaço e talos, representando na maioria das vezes mais da metade da composição total da fruta e, recentemente têm ganhado atenção em virtude de sua qualidade nutricional, quando comparado a uma porção comestível da fruta, com valores significativos de nutrientes e compostos bioativos, que apresentam efeitos benéficos à saúde humana (Can-cauich *et al.*, 2017; Campos *et al.*, 2020; Rodriguez *et al.*, 2021). O valor nutricional desses insumos revela seu potencial para uso como substratos em processos fermentativos e para o desenvolvimento de formulações com propriedades funcionais (Araújo *et al.*, 2020; da Silva *et al.*, 2023; Kapoor *et al.*, 2020; Oliveira *et al.*, 2020), como estratégia de agregar valor a essas matrizes (Campos *et al.*, 2020).

As culturas de bactérias ácido lácticas (BAL), são comumente utilizadas como culturas iniciadoras pela indústria de alimentos e farmacêutica (Cheng *et al.*, 2022). Essas culturas passam por processos de preservação (ou estabilização) que inicia a partir de seu cultivo em meio específico, seguido do processo de secagem, normalmente por liofilização, para obtenção de biomassa altamente concentrada e estável para ser usada na formulação de produtos alimentícios ou nutracêuticos (Fonseca *et al.*, 2019). O caldo de Man, Rogosa e Sharpe (CMRS) é um meio de cultivo bem estabelecido e amplamente utilizado para o cultivo de cepas probióticas, porém seu alto custo dificulta sua aplicação comercial em larga escala (Cejas *et al.*, 2017). Portanto, meios de cultivo mais econômicos que permitam uma produção satisfatória de biomassa bacteriana se fazem necessários. O valor nutricional dos coprodutos de frutas não só justificaria o seu potencial uso como ingrediente em meios de cultivos para BAL, incluindo os probióticos, mas também como agentes protetores em processos de desidratação destes microrganismos (Araújo *et al.*, 2020; Cejas *et al.*, 2017; Quintana *et al.*, 2017). Soro de leite, permeado de soro de leite, okara (resíduo da soja), broto do malte e vários outros resíduos agroindustriais têm sido propostos como meios de cultivo alternativos para a produção de

culturas probióticas (Cejas *et al.*, 2017; Golowczyc *et al.*, 2013; Quintana *et al.*, 2017). Araújo *et al.* (2020) avaliaram os efeitos protetores de coprodutos de acerola, caju e goiaba sobre cepas de *Lactobacillus* durante a desidratação bem como o armazenamento, atribuindo esse efeito protetor à composição química desses materiais, que inclui açúcares simples, oligossacarídeos (fruto-oligossacarídeos) e compostos fenólicos.

No entanto, coprodutos de frutas tropicais ainda são pouco investigados quanto ao potencial em promover uma melhor estabilidade bacteriana durante bioprocessamentos, a exemplo da fermentação e liofilização, que são empregados para obtenção de culturas probióticas. Ademais, nenhum estudo até a presente data foi realizado para avaliar a estabilidade e sobrevivência de cepas de *Lactobacillus* ao longo do armazenamento e exposição às condições do trato gastrointestinal (TGI) simulado *in vitro*, após cultivadas em meios de fermentação com coprodutos de frutas seguido de liofilização. Esse aspecto é relevante, considerando que para promover benefícios a saúde do consumidor, as bactérias probióticas devem sobreviver e se manterem viáveis e com funções fisiológicas preservadas ao longo do armazenamento e frente às condições adversas do TGI, sendo entregues em contagens viáveis para colonizar eficazmente o intestino (Wang *et al.*, 2021).

Outrossim, a riqueza em fibras e compostos fenólicos que impactam diretamente nas propriedades antioxidantes e prebióticas (Albuquerque *et al.*, 2019; Gualberto *et al.*, 2021; Miskinis *et al.*, 2023; Vega-Baudrit *et al.*, 2023) tornam os coprodutos de frutas excelentes candidatos a serem metabolizados pela microbiota colônica e exercerem diferentes efeitos fisiológicos, incluindo um efeito local na modulação da microbiota intestinal (de Souza *et al.*, 2019; Lima *et al.*, 2019; Owolabi *et al.*, 2019; Lima *et al.*, 2019; Owolabi *et al.*, 2020). Estudos sobre os efeitos simbióticos dos coprodutos de frutas fermentados por probióticos na microbiota intestinal ainda são escassos. Poucos estudos avaliaram *in vitro* potenciais propriedades prebióticas de coprodutos de frutas, relatando efeitos estimuladores no crescimento e metabolismo dos probióticos *Lactobacillus* e *Bifidobacterium*, além de aumentar a produção de ácidos graxos de cadeia curta (Menezes *et al.*, 2021a; Menezes *et al.*, 2021b).

Assim, esse estudo avaliou o uso de coprodutos de acerola, caju e goiaba associado a cepas de *Lactobacillus*, durante fermentação e liofilização, e seu impacto nos parâmetros de atividade metabólica durante a fermentação, bem como na estabilidade dessas cepas quando submetidas ao processo de desidratação, armazenamento refrigerado e exposição ao trato gastrointestinal simulado. Em soma, ainda se avaliou os efeitos dos coprodutos fermentados na abundância relativa de diferentes populações bacterianas intestinais, produção de metabólitos microbianos e capacidade antioxidante durante 48 h de fermentação fecal *in vitro*.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 FRUTAS E COPRODUTOS DO PROCESSAMENTO DE FRUTAS

A produção mundial de frutas está em constante crescimento e o Brasil se destaca como um dos principais produtores, apresentando uma produção que supera 41 milhões de toneladas, ultrapassando países como os Estados Unidos, Itália e Espanha (Gonzalez-Aguiar *et al.*, 2008; Vieira *et al.*, 2017). Favorecido pela posição geográfica, características do solo e condições climáticas, o Brasil oferece benefícios à produção de variadas espécies tropicais e subtropicais o ano inteiro (Albuquerque *et al.*, 2019; FAO/ONU, 2017; Treichel *et al.*, 2016).

As frutas tropicais e subtropicais apresentam altos níveis de compostos bioativos e propriedades funcionais relacionadas à saúde humana como resultado de sua composição nutricional. São excelentes fontes de fibras, polissacarídeos, ácidos orgânicos, vitaminas, minerais, compostos fenólicos e fitoquímicos que podem atuar na prevenção ou no tratamento de algumas doenças (Dantas *et al.*, 2023). Além das suas propriedades, as frutas tropicais têm sido apreciadas pelas suas características sensoriais atraentes e sabor exótico, favorecendo a expansão nos mercados nacional e internacional (Sayago-Ayerdi *et al.*, 2021)

As frutas são perecíveis, por esse motivo sua comercialização na forma “*in natura*” para as grandes distâncias é dificultada. Cerca de 50% da produção de frutas é destinada para o setor das agroindústrias, que as utiliza para elaboração de diversos produtos processados, como geleias, frutas desidratadas, sobremesas, néctares, xaropes, doces, sucos e polpas (Campos *et al.*, 2020; Sayago-Ayerdi *et al.*, 2021). Esse processamento favorece o consumo de produtos derivados de frutas durante todo o ano, além de agregar valor aos produtos (Orrego *et al.*, 2014).

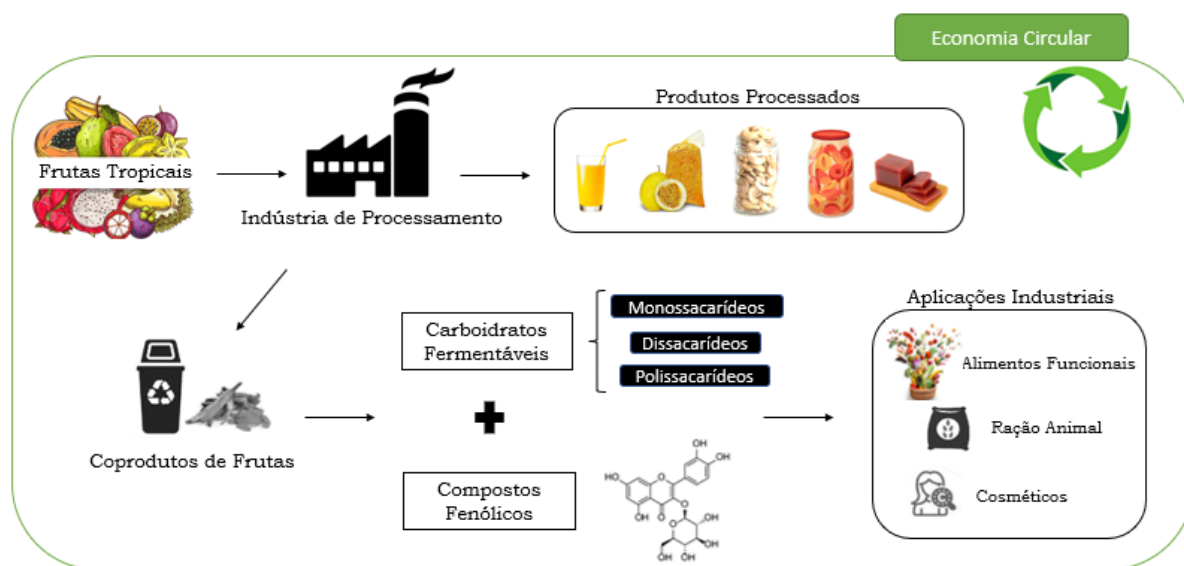
Acerola (*Malpighia glabra* L.), caju (*Anacardium occidentale* L.) e goiaba (*Psidium guajava* L.) são exemplos de frutas tropicais bastante utilizados como matéria-prima para a produção de diferentes produtos alimentícios, especialmente a produção da polpa congelada (Albuquerque *et al.*, 2019; Silva *et al.*, 2014; Sancho *et al.*, 2015). Estas frutas se destacam pelo elevado teor de nutrientes e compostos bioativos, como vitaminas C e E, carotenoides, compostos fenólicos e fibra alimentar (Barros *et al.*, 2017; Bataglion *et al.*, 2015; Paz *et al.*, 2015).

O processamento de frutas gera elevadas quantidades de coprodutos agroindustriais, constituídos principalmente de cascas, bagaço e sementes. Do total de coprodutos gerados por ano (cerca de 39000 toneladas), 91,7% é oriundo de indústrias alimentícias, e, aproximadamente, 33 toneladas/ano de sementes e 198 toneladas/ano de cascas são descartados

pela indústria de polpas, doces, néctares e de frutas que são minimamente processadas (Andrade *et al.*, 2015). Esses coprodutos não possuem um destino específico, geralmente são destinados para alimentação do gado ou descartados de forma inadequada no meio ambiente, favorecendo o acúmulo desse material no meio ambiente (Oliveira *et al.*, 2020; Majerska *et al.*, 2019). Essas matrizes representam mais de 50 % do conteúdo da fruta fresca, e recentemente tem recebido atenção especial devido a sua composição nutricional, apresentando concentrações significativas de compostos bioativos (Can-Cauich *et al.*, 2017; Campos *et al.*, 2020; Sagar *et al.*, 2018).

O tratamento, caracterização e incorporação de coprodutos agroindustriais em alimentos permite a reintrodução dessas matrizes na cadeia alimentar (Figura 1), reduzindo o desperdício, sendo considerada como uma nova tendência no modelo de economia circular, onde a simbiose e a cooperação entre as indústrias permitem a possibilidade de aproveitar ao máximo coprodutos para gerar produtos novos e seguros de valor agregado (Comunian *et al.*, 2021; Trigo *et al.*, 2020)

Figura 1. Modelo de economia circular de coprodutos agroindustriais de frutas.



Fonte: Próprio autor, 2024.

Muitos estudos têm investigado o potencial desses coprodutos de frutas. Deng *et al.* (2012) demonstrou relação positiva entre os compostos fenólicos e capacidade antioxidante da casca e semente de 50 frutas estudadas (entre elas, goiaba, abacaxi, tangerina, maçã, pera e manga). Os autores concluíram que o conteúdo de ácidos fenólicos e o poder antioxidante foram maiores nas cascas e sementes quando comparado com os valores encontrados nas polpas das

frutas analisadas. Dentre os compostos bioativos presentes nessas porções da fruta, destacam-se os compostos fenólicos, que são compostos aromáticos distribuídos de acordo com sua estrutura em ácidos fenólicos, estilbenos e flavo-nóides (flavanóis, flavanonas, flavonóis e antocianinas) (Zheng; Meenu; Xu, 2019). Os benefícios que os compostos fenólicos trazem para a saúde parecem ser parcialmente dependentes da sua conversão microbiana (Selma *et al.*, 2009), que pode ocorrer *in situ* após lesão do tecido vegetal, durante o processamento de alimentos, particularmente durante a fermentação, e pela microbiota intestinal humana após a ingestão (Requena *et al.*, 2010). A fração fenólica não absorvível permanece disponível no cólon junto com outros componentes alimentares e é transformada pela microbiota colônica em metabólitos mais ativos e melhor absorvidos (Gonçalves *et al.*, 2019, Rocchetti *et al.*, 2019).

Recentemente, outro destino inovador para os resíduos gerados no processamento de frutas tem sido explorado, como o potencial prebiótico (Bussolo de Souza *et al.*, 2019; Gil-Sanchez *et al.*, 2017). Os prebióticos são definidos como substratos utilizados seletivamente pelos microrganismos do hospedeiro que proporcionam efeitos benéficos à nossa saúde, melhorando o sistema digestivo e imunológico por meio do equilíbrio da microbiota intestinal. Algumas fibras dietéticas, especialmente oligossacarídeos resistentes (inulina, frutooligossacarídeos e galactooligossacarídeos), são bem reconhecidas na literatura como prebióticos (Gibson *et al.*, 2017). Além das fibras alimentares, estudos recentes têm mostrado a interação entre polifenóis e a microbiota intestinal, sugerindo-os como compostos candidatos a prebióticos (Sanders *et al.*, 2019; Singh *et al.*, 2020). Por essa razão, a maioria dos coprodutos de frutas são prebióticos promissores, pois são fontes de compostos fenólicos, carboidratos fermentáveis e oligossacarídeos (Comunian *et al.*, 2021). Nesse contexto, inúmeros estudos têm buscado reconhecer novos ingredientes com potencial prebiótico dietético (Albuquerque *et al.*, 2021; Massa *et al.*, 2020). Foram observados efeitos prebióticos do subproduto do caju em diferentes estirpes potencialmente probióticas de *Lactobacillus* (Duarte *et al.*, 2017). Batista *et al.* (2018) avaliou o efeito da suplementação dietética com coprodutos do processamento de frutas (acerola, caju e goiaba) em ratos wistar dislipidêmicos, sendo relatado uma diminuição dos níveis de lipídios séricos e aumento da população de bifidobactérias e lactobacilos nas fezes, além da melhora nos danos no tecido hepático causados pela dislipidemia. Resíduos de abóbora foram utilizados como substrato para cepas de *Lactobacillus casei*, que serviu para aumentar o rendimento de biomassa das células bacterianas (Genevois *et al.*, 2016).

Considerando que os coprodutos de frutas se destacam por sua composição química, incluindo fibras alimentares, compostos bioativos e alta atividade antioxidante, seu aproveitamento torna-se essencial para serem utilizados como ingredientes alimentares

funcionais ou para aplicação na indústria farmacêutica que podem atuar prevenção ou tratamento de doenças humanas (Albuquerque *et al.*, 2019).

2.1.1 Acerola (*Malpighia glabra* L.)

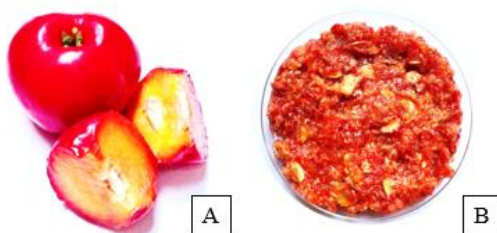
A acerola ou aceroleira (*Malpighia glabra* L.) é uma fruta tropical nativa das ilhas do Caribe, cultivada em diversas regiões, principalmente nas de clima tropical e subtropical, incluindo o Brasil, que se destaca por ser o maior produtor do mundo dessa fruta, sendo também o principal consumidor e exportador (Barros *et al.*, 2020; Cruz *et al.*, 2019). O país possui plantios de acerola em praticamente todos os estados, destacando-se os estados do Nordeste, onde a Bahia, Ceará, Paraíba e Pernambuco são responsáveis por, aproximadamente, 60% da produção nacional (Furlaneto; Nasser, 2015). Além do Brasil, a acerola é cultivada no México, na China e em algumas partes do Sudeste Asiático e na Índia (Xu *et al.*, 2020).

A acerola é conhecida por ser uma fruta rica em vitamina C (na faixa de 1.500 a 4.500 mg/100 g) maior que outras frutas cítricas como laranja e limão, além disso, é uma excelente fonte de outros componentes bioativos, como antocianinas, carotenoides, flavonoides e compostos fenólicos (Aparicio-García *et al.*, 2020; Ellong *et al.*, 2015; Prakash; Baskaran, 2018; Ribeiro; de Freitas, 2020). Apresenta-se como uma fruta de fácil cultivo, carnosa, variando na sua forma, tamanho e peso, sendo constituída pelo epicarpo (casca externa), mesocarpo (polpa da fruta) e endocarpo (constituído de três caroços unidos), que dá à fruta aspecto trilobado (Figura 2A). No interior de cada caroço está presente a semente, com 3 a 5 mm de comprimento, com forma ovoide e com dois cotilédones (Almeida *et al.*, 2011). Seu aroma e sua composição química são dependentes das condições climáticas e do estágio de maturação da fruta (Nogueira, 2002). Comumente utilizada na indústria para produção de polpas, sucos, geleias, a acerola apresenta grande potencial de utilização na produção de suplementos alimentares que melhoram a resposta imune do organismo devido à presença de compostos antioxidantes e alto teor de vitamina C (Belwal *et al.*, 2018; Silva *et al.*, 2016). No Brasil, quase toda a produção de acerola é processada industrialmente, gerando assim, uma grande quantidade de resíduos ou coprodutos agroindustriais, que representa 20-30% do peso da fruta fresca (Borges *et al.*, 2021).

Os coprodutos (Figura 2B) originados do processamento da acerola possuem uma cor avermelhada, constituído principalmente por sementes, cascas e em menor quantidade, mas ainda sim presente polpa macerada (Realini *et al.*, 2015; Ferreira *et al.*, 2019). Estes coprodutos apresentam alto valor nutricional, com quantidades consideráveis de compostos bioativos já

identificados, com potencial de uso como suplementação alimentar (Bortolotti *et al.*, 2013; Ferreira *et al.*, 2019; Ramadan; Duarte; Barrozo, 2018). A partir disso, existe um interesse global para utilização desses coprodutos.

Figura 2. A: Acerola (*Malpighia glabra* L.); B: Coproduto do processamento da acerola.



Fonte: Próprio autor, 2024.

Estudo realizado por Sousa e Vieira (2011) avaliou a capacidade antioxidante de coprodutos de polpas de frutas, e mostrou que o coproduto de acerola apresentou maior capacidade antioxidante em comparação com os demais coprodutos de frutas analisadas. Silva *et al.* (2016) relataram um maior teor de antocianinas e flavonóides no coproduto de acerola quando comparado à polpa do fruto. Foi visto que para cada 100 g de coproduto seco, encontrou 182,2 a 1266,8 mg de ácido gálico (referente a compostos fenólicos totais - TPC), 134,6 a 182,2 mg de vitamina C e cerca de 63,9 mg de antocianinas (Sancho *et al.*, 2015; Silva *et al.*, 2019). Recentemente um estudo utilizou o resíduo da acerola para produção de uma farinha com potencial de uso como fonte de fibra e compostos antioxidantes, para ser utilizada como um novo ingrediente na indústria alimentícia (Monteiro *et al.*, 2020). Além disso, o coproduto da acerola parece ser seletivamente fermentado por cepas probióticas quando comparada a *Escherichia coli* e *Clostridium perfringens*, podendo contribuir para o enriquecimento alimentar por meio da produção de folato por cepas de lactobacilos e estreptococos (Albuquerque *et al.*, 2016; Vieira *et al.*, 2017).

Devido ao seu alto teor de umidade (aproximadamente 80%), o aproveitamento desse coproduto é complicado, então técnicas de secagem podem ser aplicadas a fim de tornar esse material mais estável e apto para adição como ingrediente em produtos alimentícios (Cruz *et al.*, 2019; Ramadan; Duarte; Barrozo, 2018; Mekki *et al.*, 2017). Com base nessas informações, e devido ao seu elevado conteúdo de compostos bioativos (Cruz *et al.*, 2019), o coproduto do processamento de acerola pode ser um constituinte promissor para o desenvolvimento de novos alimentos funcionais com efeitos benéficos à saúde humana.

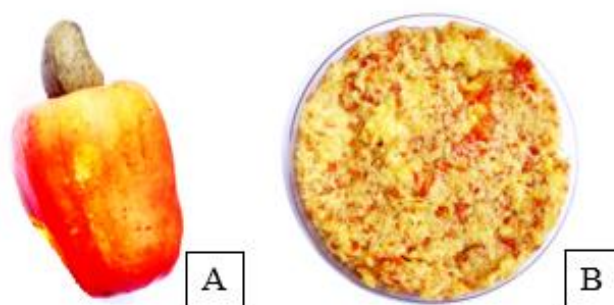
2.1.2 Caju (*Anacardium occidentale* L.)

O caju é a fruta do cajueiro (*Anacardium occidentale* L.), pertencente à família das Anacardeáceas, nativa do Brasil, apresenta características sensoriais e nutricionais distintas. O caju é amplamente explorado e comercializado mundialmente, sendo o Brasil, Índia e Vietnã os países que apresentam maior produção, com destaque para Índia, responsável por cerca de 50% da produção mundial (Prakash *et al.*, 2018).

É considerada como uma das principais frutas comercializadas no Brasil, com destaque para a região Nordeste (de Souza Lima *et al.*, 2022). Adaptada ao clima tropical, o caju é responsável pela maior parte do agronegócio da região nordeste, com produção de 217,062 toneladas de castanha e 2 milhões de toneladas de pseudofruto por ano (Abreu *et al.*, 2013; Pinho *et al.*, 2011). Seu cultivo está relacionado principalmente ao valor nutricional da sua castanha, reconhecido por apresentar um elevado teor de gorduras insaturadas, fibras e minerais (Carr, 2014).

O caju é uma fruta de alto valor nutricional, encontrada nas cores amarelo, laranja e vermelho (Figura 3A), com polpa amarelo pálido, pesando cerca de 75-80 g, com 6-10 cm de comprimento (Garruti *et al.*, 2003; Talasila; Shaik, 2015). É formada por duas partes: i) a castanha, a qual é definida como o verdadeiro fruto, contendo no seu interior a amêndoa, sendo o principal produto de exportação; ii) e o pedúnculo, que é o seu pseudofruto, com característica de adstringência, sabor forte e exótico, conteúdo carnoso e fibroso, sendo considerado bastante nutritiva, apresenta pele sensível a danos mecânicos durante o processamento pós-colheita (manuseio, embalagem e transporte) (Carr, 2014). Por isso, os pseudofrutos estão sujeitos a tensões que podem acarretar alterações fisiológicas e metabólicas, gerando amolecimento do tecido, perda de sabor e cor, exigindo, assim, maiores cuidados, principalmente, com o transporte (Barreto *et al.*, 2007). O pseudofruto é rico em compostos antioxidantes como vitamina C (Rodriguez *et al.*, 2017), carotenóides (Abreu *et al.*, 2013), compostos fenólicos como ácido gálico, ácido elágico, quercetina, miricetina e ácido anacárdio (Lopes *et al.*, 2018), esses compostos são encontrados tanto na polpa quanto na casca do pseudofruto (Schweiggert *et al.*, 2016).

Figura 3. A: Caju (*Anacardium occidentale* L.); B: Coproduto do processamento do caju.



Fonte: Próprio autor, 2024.

Enquanto a castanha recebe destaque devido ao seu conteúdo nutricional, o pseudofruto perde seu valor comercial devido sua elevada perecibilidade. Por esse motivo, a maior parte da produção do pseudofruto é destinada para as indústrias de processamento de frutas (Duarte *et al.*, 2017; Prakash *et al.*, 2018). A indústria utiliza o caju como matéria-prima para a fabricação de diversos produtos alimentícios, sendo o pedúnculo do caju utilizado para a produção de sucos, doces, refrigerante, néctar e polpa congelada (Andrade *et al.*, 2015; Fonteles *et al.*, 2017).

Cerca de 1,8 milhões de toneladas de caju são processadas anualmente para obter a castanha e mais de 80% dos pedúnculos (pseudofruto) são descartados após a remoção da amêndoa (Albuquerque *et al.*, 2015; Talasila; Shaik, 2015). De toda a produção desse fruto apenas 5% da produção do pedúnculo é explorada comercialmente, o restante é desperdiçado (Talasila; Shaik, 2015). Assim sendo, o processamento do pedúnculo contribui para o aumento da vida de prateleira, além de facilitar o transporte e agregar valor ao produto (Duarte *et al.*, 2017; Prakash *et al.*, 2018). Sendo o suco, o principal produto derivado do pedúnculo do caju, o qual é obtido pelo processo mecânico utilizando prensa extratora (Fonteles *et al.*, 2017; Queiroz *et al.*, 2011).

Apesar do processamento contribuir para uso do pedúnculo como forma de aproveitamento, os produtos industrializados derivados favorecem a geração de uma grande quantidade de coprodutos agroindustriais (Andrade *et al.*, 2015). O material obtido após o processamento do pedúnculo do fruto possui aspecto fibroso e denso (Figura 3B), de coloração amarelada, constituído pela casca e partes da polpa, que representa cerca de 70% do peso total do fruto (Sawadogo *et al.*, 2018).

Um estudo realizou a quantificação de antocioninas, compostos fenólicos, vitamina C, ácidos graxos insaturados, manganês e fósforo em diversos coprodutos de frutas. Nesse estudo, o caju se caracterizou como boa fonte de manganês e de ácido graxos insaturados (Sancho *et al.*, 2015). Duarte *et al.* (2017) avaliaram os efeitos prebióticos do coproduto do pedúnculo de

caju sob cepas probióticas, resultando em uma intensa atividade metabólica bacteriana, podendo ser utilizado como um ingrediente de valor na indústria alimentícia. Foi observado que após o processo a digestão, o coproduto de caju aumentou significativamente grupos bacterianos da microbiota humana, além de aumentar a produção de ácidos graxos de cadeia curta (AGCC) e diminuir o pH em meios de fermentação colônica, indicando assim, propriedades prebióticas, que foram associados ao conteúdo de fibras e a presença de uma grande variedade de compostos fenólicos no coproduto de caju (Menezes *et al.*, 2021b). Assim, os coprodutos do caju podem constituir uma matéria-prima rica em compostos antioxidantes para ser utilizada pela indústria de produção de alimentos, reduzindo a grande quantidade de resíduos agroindustriais gerados atualmente no Brasil que normalmente são descartados no meio ambiente ou utilizados como alimentação animal.

2.1.3 Goiaba (*Psidium guajava* L.)

A goiaba (*Psidium guajava* L.) é uma fruta tropical pertencente à família Myrtaceae, amplamente consumida devido ao seu sabor doce, composição nutricional e propriedades terapêuticas (Silva *et al.*, 2021). A goiaba é naturalmente enriquecida de vários compostos bioativos, incluindo a vitamina C, fenólicos totais, carotenóides, fibras alimentares e minerais, o que poderia classificar a goiaba como uma superfruta. (Kumar *et al.*, 2022; Sahu *et al.*, 2020).

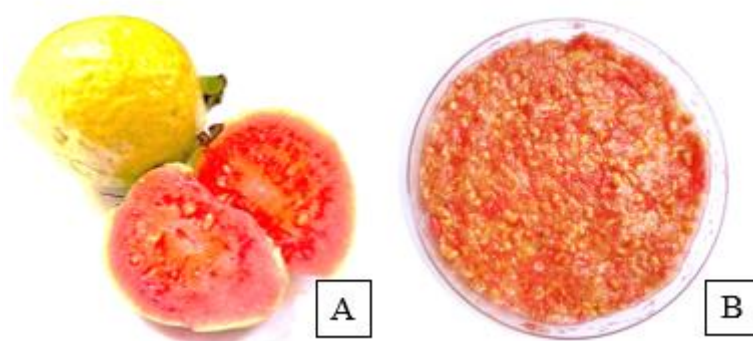
A produção global de goiaba foi de aproximadamente 55,85 milhões de toneladas no ano de 2019 (Kumar *et al.*, 2022). Vários países são produtores dessa fruta devido à grande variedade de espécies (324 espécies de goiaba), o Brasil apresenta uma produção de 424.305 toneladas de goiaba por ano, é considerado o terceiro maior produtor e exportador dessa fruta, seguido do Paquistão e Índia (Lima *et al.*, 2019; Triechel, 2016). Sua produção em território brasileiro representa, aproximadamente, 280 mil toneladas, concentradas nos meses de fevereiro a março, embora sua comercialização da fruta ocorra o ano inteiro (Zanatta; Zotarelli; Clemente, 2006).

A goiabeira é uma planta de pequeno porte, que pode atingir de 3 a 6 metros de altura. A fruta apresenta forma arredondada ou baga globosa (Figura 4A), ovoides ou piriformes, de 4 a 12 cm de comprimento, apresenta sabor levemente doce e aroma suave, variando a cor da polpa de acordo com a espécie, sendo que a goiaba com a polpa de cor vermelha apresenta melhores aspectos nutricionais (Lima *et al.*, 2019). Apresenta em sua composição nutrientes como, vitamina C e vitamina E, sendo rica em zinco e niacina. Ainda, apresenta elevados teores de selênio, cobre, fósforo, magnésio, cálcio, ferro, ácido fólico e vitaminas A, B1, B2 e B6,

compostos fenólicos e fibras dietéticas (Uchôa-Thomaz *et al.*, 2014; Ling; Chang, 2017). Estudos detectaram elevados níveis de licopeno na goiaba de polpa vermelha e teores significativos de ácido ascórbico e fibras na goiaba de polpa branca (Kong *et al.*, 2010; Lima *et al.*, 2019).

O consumo *in natura* é baixo, cerca de 70 % da sua produção de goiaba é destinada para indústria para produção de sucos, néctares, polpa, xaropes e geleia (Del'arco; Sylos, 2018; Narváez-Cuenca *et al.*, 2020). O processamento em larga escala da goiaba em vários produtos gera uma grande quantidade de coprodutos, criando o problema de descarte de resíduos. Em particular, o processamento de uma tonelada métrica de frutos de goiaba produz aproximadamente 80 kg de resíduos (Ling; Chang, 2017). Estima-se que 30% do volume total de goiabas processadas seja perdido na forma de coprodutos (restos de polpa, sementes e casca). Um total de cerca de 70 mil toneladas de coprodutos agroindustriais são produzidos, um material rico em compostos bioativos que na maioria das vezes são descartados (Triechel, 2016).

Figura 4. A: Goiaba (*Psidium guajava* L.); B: Coproduto do processamento da goiaba.



Fonte: Próprio autor, 2024.

As goiabas também são amplamente pesquisadas como fonte para a extração de compostos fenólicos. Algumas delas estão sendo consideradas “superfrutas”, que é um novo termo aplicado a frutas exóticas que contêm altos níveis de compostos antioxidantes, como fenólicos, carotenóides, ácido ascórbico, entre outros (Chang *et al.*, 2018). Além disso, como já afirmado por vários autores, os coprodutos das superfrutas são uma fonte potencial para a produção de ingredientes em pó a serem utilizados na formulação de alimentos funcionais de valor agregado (Chang *et al.*, 2018; Peixoto *et al.*, 2016). Estudo realizado por Sancho *et al.*

(2015) mostrou que o coproduto de goiaba apresentou boas quantidades de antocianinas, principalmente, quando comparados à porção comestível da fruta.

Lim *et al.* (2018), diz que devido as altas quantidades de coprodutos gerados do processamento de frutas, é necessário encontrar formas de utilização desses materiais, extraindo compostos úteis para aplicação em novos produtos, podendo, dessa forma, reduzir os impactos indesejáveis relativos à poluição ambiental causada pelo setor agroindustrial. Com base nessas informações, estudos que explorem a utilização desses coprodutos são necessários para avaliar o potencial de uso como matriz para a obtenção de novos produtos de interesse da indústria.

2.2 MICROBIOTA INTESTINAL, PROBIÓTICOS E PREBIÓTICOS

A microbiota intestinal humana é constituída por um ecossistema complexo e dinâmico, formado por milhões de microrganismos que desempenham funções metabólicas, imunológicas e protetoras (Larsen; Claassen, 2018; Peredo-Lovillo *et al.*, 2020). Nos últimos anos, o interesse pela microbiota intestinal cresceu devido ao seu papel fundamental no estabelecimento e manutenção da saúde humana (Hou *et al.*, 2020; Guo *et al.*, 2022; Segal *et al.*, 2019). Vários fatores internos e externos podem modular a composição da microbiota intestinal, como genética, fisiologia do hospedeiro e fatores ambientais (alimentação, estilo de vida, uso de produtos farmacêuticos) desde a primeira infância até a idade adulta (Jin *et al.*, 2017; Lozupone *et al.*, 2012). Nesse contexto, suplementos dietéticos, incluindo probióticos, prebióticos ou simbióticos (junção de probióticos e prebióticos) podem ser utilizados para promover melhorias na saúde intestinal (Coman; Vodnar, 2020). Atualmente, as bactérias ácido lácticas (BAL) são utilizadas como alimento de fermentação ou probióticos em pó, a fim de modular a imunidade e consequentemente à saúde do hospedeiro (Daba; Elkhateeb, 2020; Wang *et al.*, 2015; Wang *et al.*, 2020).

As bactérias ácido lácticas (BAL) são bactérias gram-positivas e não formadoras de esporos, pertencentes principalmente aos gêneros *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Bifidobacterium*, *Enterococcus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus* e *Streptococcus* (Romero-Luna *et al.*, 2022). Essas bactérias produzem principalmente ácido lático pela fermentação de carboidratos simples (frutose, glicose e maltose), multiplicam-se em temperaturas que variam de 5 a 45 °C, com condições de pH entre 5,5 e 6,5 e são anaeróbias ou anaeróbias facultativas, amplamente utilizadas como culturas iniciadoras e como probióticos (Bangar *et al.*, 2022; Hirasawa; Kurita-Ochiai, 2020; Saarela *et al.*, 2009). Os probióticos são definidos como “microrganismos vivos que, quando administrados em quantidades adequadas, conferem benefícios à saúde do

hospedeiro” (WHO/FAO, 2002). Sendo esse conceito o mais adotado e aceito mundialmente (Health Canada, 2009; Hill *et al.*, 2014). Com a revisão do conceito, os especialistas definiram implicações regulatórias para a utilização do termo probiótico, classificando quanto a sua utilização, como: culturas vivas ou ativas presentes em produtos alimentícios, probióticos em alimentos ou suplementos com alegação de saúde e medicamento probiótico com uso específico para o tratamento da saúde (Quigley, 2019).

Entre os principais benefícios das culturas probióticas se destacam a homeostase da microbiota intestinal, diminuição da população de patógenos, promoção da digestão da lactose em indivíduos intolerantes à lactose, alívio da constipação, efeito antidiabético, antidepressivo, melhora da absorção de minerais e produção de vitaminas (Finamore *et al.*, 2019; Gayathri; Rashmi, 2017; Meng *et al.*, 2020; Miri *et al.*, 2022; Nikbakht *et al.*, 2018; Saad *et al.*, 2012; Zhao, *et al.*, 2021). Alguns estudos (Li *et al.*, 2014; Sadrzadeh-Yeganeh *et al.*, 2010; Zhang *et al.*, 2017) confirmam que a administração de cepas probióticas pode modular o metabolismo lipídico, e também exercer ação hipolipemiante, podendo ser utilizado no controle dos desequilíbrios decorrentes da obesidade (Zhang *et al.*, 2017).

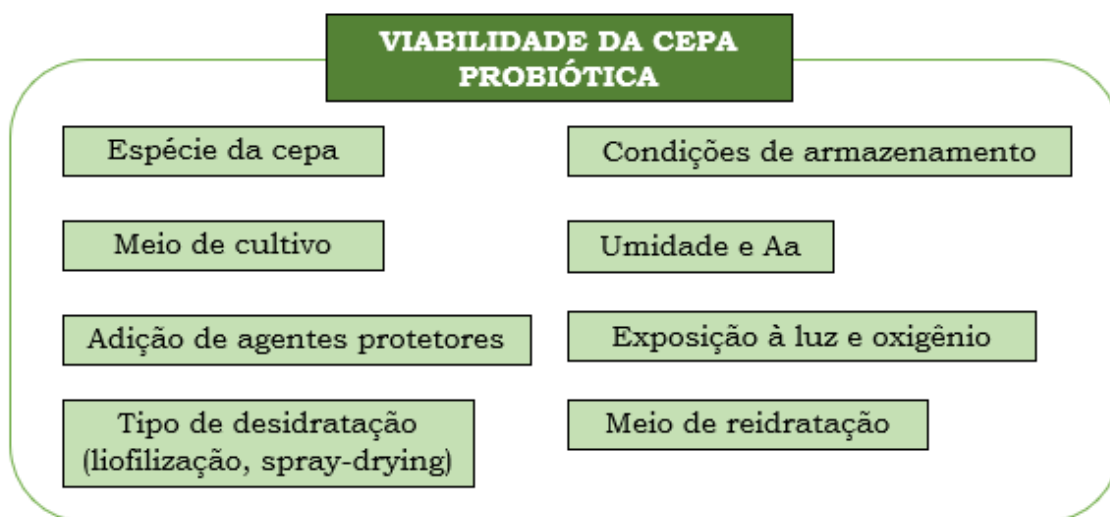
Para gerar benefícios à saúde do hospedeiro, os probióticos devem manter a alta viabilidade durante o processamento, armazenamento e serem capazes de sobreviver à passagem através do estômago a fim de se proliferar no intestino (Vandenplas, Huys, Daube, 2015). O conceito da FAO/WHO (2002) não estabelece exatamente uma quantidade adequada de microrganismos probióticos que possa gerar benefícios para a saúde do hospedeiro. A legislação brasileira afirma que as alegações de saúde reivindicadas para determinada cepa deverão ser comprovadas caso a caso com estudos que claramente confirmem que determinada dose viável de células quando ingerida irá fornecer os efeitos alegados (Brasil, 2016). Apesar disso, autores sugerem quantidades mínimas de 10^6 - 10^7 de UFC por grama ou mililitro de células viáveis do microrganismo probiótico em produtos alimentícios para que possam proporcionar benefícios à saúde (Gebara *et al.*, 2015).

2.2.1 Obtenção industrial de cepas probióticas

A exploração industrial da BAL como cultura inicial depende de suas tecnologias de concentração e preservação, que podem garantir a entrega de culturas estáveis em termos de viabilidade e atividade funcional (Youssef *et al.*, 2016). Vários fatores podem influenciar na viabilidade das cepas bacterianas probióticas (Figura 5), como espécie, população inicial de microrganismos, condições de fermentação, adição de agentes protetores, meio liofilizado,

parâmetros de secagem, condições de reidratação, armazenamento e passagem pelo trato gastrointestinal (Chen *et al.*, 2015; Fonseca *et al.*, 2019; Lu *et al.*, 2017; Razavi *et al.*, 2021; Santos *et al.*, 2014; Strasser *et al.*, 2009; Wang *et al.*, 2021).

Figura 5. Fatores que podem influenciar na viabilidade das cepas probióticas.



Fonte: Próprio autor, 2024.

Atualmente, o caldo MRS é o meio de cultivo de cepas probióticas mais utilizado, porém seu custo não é compatível com aplicações em larga escala (Cejas *et al.*, 2017). A escolha do meio de crescimento exerce grande influência sob a quantidade de biomassa bacteriana produzida, para aplicações probióticas lácteas, as cepas geralmente são cultivadas em meios à base de leites suplementados com diversos ingredientes, como extrato de levedura, extrato de malte e hidrolisados de caseína e leite (Gomes *et al.*, 1998; Avonts *et al.*, 2004; Burns, *et al.*, 2008). Já para aplicações não lácteas, o meio deve apresentar componentes que não são derivados de animais, como extrato de levedura e peptonas de vegetais (Heenan *et al.*, 2002; Matto *et al.*, 2006). Essa fermentação que antecede a desidratação pode afetar significativamente a viabilidade desses microrganismos, tanto positivamente como negativamente. Os principais parâmetros a serem observados durante a fermentação são: a composição do meio, as fases de crescimento dos microrganismos e avaliação dos parâmetros metabólicos (pH) (Carvalho *et al.*, 2004; Dimitrellou *et al.*, 2016; Saarela *et al.*, 2005; Meng *et al.*, 2008). Então, quando se propõe um novo meio de cultivo é necessário estudar toda sua composição para entender melhor a relação entre o processo de fermentação e a sobrevivência celular durante os processos de desidratação.

A liofilização é um dos métodos de preservação mais utilizados pela indústria de alimentos para o armazenamento a longo prazo de amostras biológicas, considerada como um dos métodos mais adequadas para produzir culturas iniciadoras concentradas (Heidebach *et al.*, 2010; Wang *et al.*, 2021). Seu método consiste na remoção da água, onde a amostra é congelada (formação de cristais de gelo) e em seguida, a sublimação (sob alto vácuo) do gelo associada à baixa pressão (Fonseca *et al.*, 2015; Chen *et al.*, 2023). Todo o processo consiste em três etapas: congelamento, desidratação primária (sublimação) e desidratação secundária (dessorção). Durante o congelamento, cristais de gelo extracelulares são formados, que podem levar a danos nas células bacterianas, e a concentração de solutos na água restante descongelada pode resultar em lesões químicas e osmóticas (Cassani; Gomez-Zavaglia; Simal-Gandara, 2020; Cui *et al.*, 2018). A remoção de água que ocorre durante o processo gera danos na estrutura das proteínas da parede celular e no estado físico das membranas lipídicas (Tymczyszyn *et al.*, 2007). Esse tipo de preservação pode causar alterações estruturais, que, por sua vez podem afetar a integridade bacteriana resultando em uma diminuição da viabilidade bacteriana (Tymczyszyn *et al.*, 2008). Apesar disso, a liofilização é uma técnica de desidratação superior quando comparada com as demais existentes, sendo considerado o método que causa menor dano na célula bacteriana, por isso, é o mais empregado pela indústria biotecnológica.

Uma das formas eficazes de aumentar as taxas de sobrevivência de microrganismos durante a liofilização é a adição de agentes protetores ao meio (principalmente antes do congelamento) (Wang *et al.*, 2021). Esses agentes atuam na substituição da água que está no interior das células da bactéria, estabilizando os lipídeos e proteínas da membrana celular, favorecendo a manutenção da integridade funcional das células desidratadas (Leslie *et al.*, 1995; Schwab *et al.*, 2007; Strasser *et al.*, 2009). Uma variedade de agentes protetores tem sido usada para reduzir os efeitos danosos por liofilização, como leite desnatado, glicerol, sorbitol, trealose, sacarose, maltose, lactose, frutose, glicose, betaína e aminoácidos (Bosnea *et al.*, 2009, Carvalho *et al.*, 2004, Chotiko; Sathivel, 2014, Dimitrellou *et al.*, 2016; Tymczyszyn *et al.*, 2011). Estas substâncias podem minimizar as mudanças no estado físico dos lipídios de membrana ou diminuir as mudanças na estrutura da proteína sensível dos sistemas biológicos após a liofilização, melhorando assim a viabilidade celular na liofilização (Hubálek, 2003).

Açúcares, como os galacto-oligossacarídeos (GOS) e lactulose demonstraram boas propriedades protetoras durante os processos de desidratação (Tymczyszyn *et al.*, 2011; Tymczyszyn *et al.*, 2012). Shu *et al.* (2012) relataram efeito protetor de fruto-oligossacarídeos (FOS), isomalto-oligossacarídeos, inulina e xiloxigossacarídeos em *B. bifidum* liofilizado. FOS também se mostrou com efeito protetor sobre *L. acidophilus* e *Lactococcus cremoris* durante

a liofilização, secagem por pulverização e posterior armazenamento (Dianawati; Mishra; Shah, 2013). Além de carboidratos bem conhecidos como a sacarose e trealose usados durante a desidratação e armazenamento, outros carboidratos também demonstraram um papel protetor, como compostos prebióticos, é o caso das fibras que foram relatados recentemente como compostos protetores eficazes (Romano *et al.*, 2015; Romano *et al.*, 2016; Santos *et al.*, 2014). O subproduto da soja denominado de okara, demonstrou ser uma matriz inovadora capaz de estabilizar o *Lactobacillus plantarum* durante o processo de desidratação, sendo considerado um ingrediente com promissoras aplicações na indústria (Quintana *et al.*, 2017). O broto de malte, subproduto subutilizado da cerveja, gerado pela indústria do malte foi utilizado como meio de cultivo, desidratação e armazenamento de três linhagens de *Lactobacillus*, visto como uma matriz inovadora para a produção de *lactobacillus* em larga escala (Cejas *et al.*, 2017). Também foi verificado que coprodutos de frutas (acerola, caju e goiaba) foram utilizados como agentes de proteção durante a liofilização e posteriormente o armazenamento (Araújo *et al.*, 2020). O efeito protetor desses compostos utilizados nos estudos descritos acima durante a liofilização é atribuído às interações diretas com proteínas e membranas.

O controle das condições de armazenamento é outro fator de grande importância para manter a viabilidade bacteriana, para isso alguns parâmetros devem ser monitorados a longo prazo, como a temperatura de armazenamento, teor de umidade, atividade de água (Aa) e exposição à luz e oxigênio (Broeckx *et al.*, 2016). A temperatura de armazenamento tem efeito direto na viabilidade das cepas bacterianas, assim, quanto menor temperatura de armazenamento maior é a viabilidade do probiótico (Savini *et al.*, 2010). Foi relatado que baixas temperaturas (1-4 °C) preservaram a viabilidade dos probióticos, reduzindo a oxidação lipídica (Nunes *et al.*, 2018; Reyes *et al.*, 2018). Uma estratégia que pode ser aplicada para garantir uma melhor viabilidade dos probióticos durante o armazenamento a longo prazo, é o controle do teor de umidade e Aa das matrizes, evitando crescimento de microrganismos e reações químicas indesejáveis, permitindo uma maior recuperação bacteriana durante o armazenamento (Cassani; Gomez-Zavaglia; Simal-Gandara, 2020; Dinkci; Akdeniz; Akalin, 2019).

A presença de oxigênio também é relatada como um fator de impacto negativo à sobrevivência dos microrganismos durante o armazenamento, processos oxidativos podem ocorrer, provocando alterações nas membranas lipídicas que vão afetar diretamente a permeabilidade da membrana das células (Muller *et al.*, 2009). Além disso, compostos provenientes da peroxidação lipídica podem afetar de modo direto o DNA, sendo considerados compostos tóxicos para os microrganismos (Kurtmann *et al.*, 2009). Para prevenir o dano oxidativo que possa ocorrer é necessário recorrer algumas estratégias, como a redução do teor

de oxigênio para o mais baixo possível, adição de compostos antioxidantes e a seleção de embalagens adequadas, onde uma embalagem adequada pode evitar tanto a exposição ao oxigênio e como a exposição a luz (Cassani; Gomez-Zavaglia; Simal-Gandara, 2020).

Outro fator relevante é o processo de reidratação das cepas, que independente da desidratação empregada, os microrganismos precisam ser reidratados para se obter células ativas antes de serem incorporados aos produtos alimentícios, por isso, essa etapa é fundamental no processo, afim de recuperar a função normal das células microbianas após a desidratação (Cassani; Gomez-Zavaglia; Simal-Gandara, 2020). Esse processo consiste em quatro etapas: molhagem, submersão, dispersão e dissolução, sendo a molhagem do pó um ponto crítico de controle (Muller *et al.*, 2009). Para evitar perdas de viabilidade nesse processo, alguns parâmetros podem ser analisados, como a composição do meio de reidratação (pH, osmolaridade e fonte nutricional) e condições como temperatura, velocidade, volume e tempo (Broeckx *et al.*, 2016). Foi relatado que o aumento da temperatura de hidratação melhorou a recuperação bacteriana (Huang *et al.*, 2017), porém isso pode mudar de acordo com o tipo de desidratação como também pela espécie dos microrganismos.

O objetivo dos microrganismos probióticos é o intestino, sendo a ingestão oral a principal via de administração, os microrganismos devem sobreviver ao pH ácido do estômago e a presença de sucos digestivo (enzimas digestivas), essas etapas representam um desafio para as bactérias alcançar o intestino e exercer assim seu objetivo, colonizar e trazer benefícios a saúde de quem consome (Palanivelu *et al.*, 2022). Entretanto, algumas bactérias benéficas perdem a viabilidade quando expostas às condições gastrointestinais, revelando elevada susceptibilidade a essas condições (Razavi *et al.*, 2021). Estratégias podem ser adotadas para melhorar a sobrevivência em condições adversas, como a seleção de cepas probióticas naturalmente resistentes a esses ambientes, incorporação de micronutrientes no meio de cultivo, microencapsulação (Dowarah *et al.*, 2018; Martín *et al.*, 2015; Santos *et al.*, 2019; Sampaio *et al.*, 2021). Estudos tem avaliado a associação de probióticos com matrizes consideradas prebióticas com o intuito de aumentar a sobrevivência desses microrganismos quando expostos a condições estressantes, incluindo o processamento tecnológico e a passagem pelo TGI (Cejas *et al.*, 2017; Guergoletto *et al.*, 2009; Martins *et al.*, 2019; Romano *et al.*, 2016).

Gibson *et al.* (2017) define o termo prebiótico como, substrato utilizado seletivamente por micro-organismos que confere benefícios à saúde. Esse substrato tem função de melhorar a microbiota intestinal, regulando a imunidade, afetando positivamente o metabolismo e aumentando a absorção de minerais (Joshi *et al.*, 2018). Existe vários tipos de prebióticos, porém a maioria é um subconjunto de carboidratos, principalmente oligossacarídeos, como

frutanos (inulina e fruto-oligossacarídeo ou oligofrutose), galacto-oligossacarídeos, oligossacarídeos derivados de amido e glicose (amido resistente) e oligossacarídeo péctico (pectina) (Davani-Davari *et al.*, 2019).

Compostos prebióticos não são hidrolisados na parte superior do trato gastrointestinal, chegando ao intestino quase intactos, onde são fermentados pela microbiota intestinal benéfica, aumentando seletivamente seu crescimento e/ou atividade (Gibson *et al.*, 2010). Borgues *et al.* (2016) constatou uma melhor viabilidade bacteriana da cepa *Lactobacillus plantarum*299v na banana em pó em comparação com as outras duas frutas secas (morango e maçã), sendo esse efeito protetor da banana atribuído à sua estrutura, rica em fibras, que pode proporcionar uma maior proteção bacteriana durante o processamento. A incorporação desses compostos em formulações probióticas representa uma estratégia interessante para garantir a chegada segura dos microrganismos probióticos ao intestino humano, proporcionando também benefícios advindos da ingestão de prebióticos. Essa função desses novos ingredientes alimentícios abre caminhos inovadores para o desenvolvimento de alimentos funcionais combinando vantagens tecnológicas e fisiológicas. Ou seja, combinam a capacidade protetora durante os processos de desidratação (vantagem tecnológica) e seus benefícios à saúde associados ao seu efeito prebiótico (vantagem fisiológica).

Abordagens inovadoras que valorizam coprodutos obtidos em grandes quantidades pelas indústrias alimentícias têm sido propostas como estratégias inteligentes para estabilizar microrganismos probióticos de maneira econômica e resolver problemas de resíduos industriais (Quintana *et al.*, 2017; Pereira; Rodrigues, 2018). Diante do exposto, o desenvolvimento desse estudo pode gerar contribuições científicas, tecnológicas e socioeconômicas por abordar uma temática promissora e ainda pouco explorada, que pode gerar um novo produto como meio de cultivo de cepas probióticas, melhorando sua estabilidade frente aos processos de desidratação, armazenamento e exposição ao trato gastrointestinal, como também atuar na modulação benéfica da microbiota intestinal.

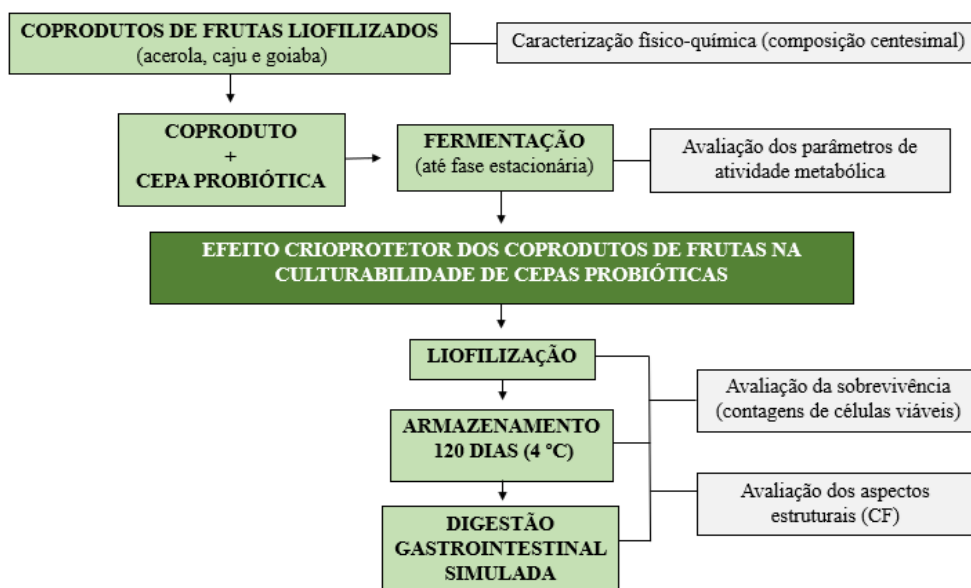
3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 LOCAL DE EXECUÇÃO DA PESQUISA E DELINEAMENTO EXPERIMENTAL

Os experimentos foram realizados no Laboratório de Microbiologia e Bioquímica de Alimentos (LMBA) e no Laboratório de Bromatologia (LABROM) do Departamento de Nutrição, da Universidade Federal da Paraíba (DN/UFPB); no Laboratório Multiusuário de Caracterização e Análises do Instituto de Pesquisa em Fármacos e Medicamentos, da Universidade Federal da Paraíba (LMCA/IPeFarM/UFPB); no Laboratório de Controle de Qualidade Físico-Químico, do Departamento de Ciências Farmacêuticas, da Universidade Federal da Paraíba (LCQFC/DCF/UFPB), *Campus I*, João Pessoa – PB, Brasil; e no Laboratório Experimental de Alimentos (LEA), do Departamento de Tecnologia de Alimentos, do Instituto Federal do Sertão Pernambucano, Petrolina – PE, Brasil.

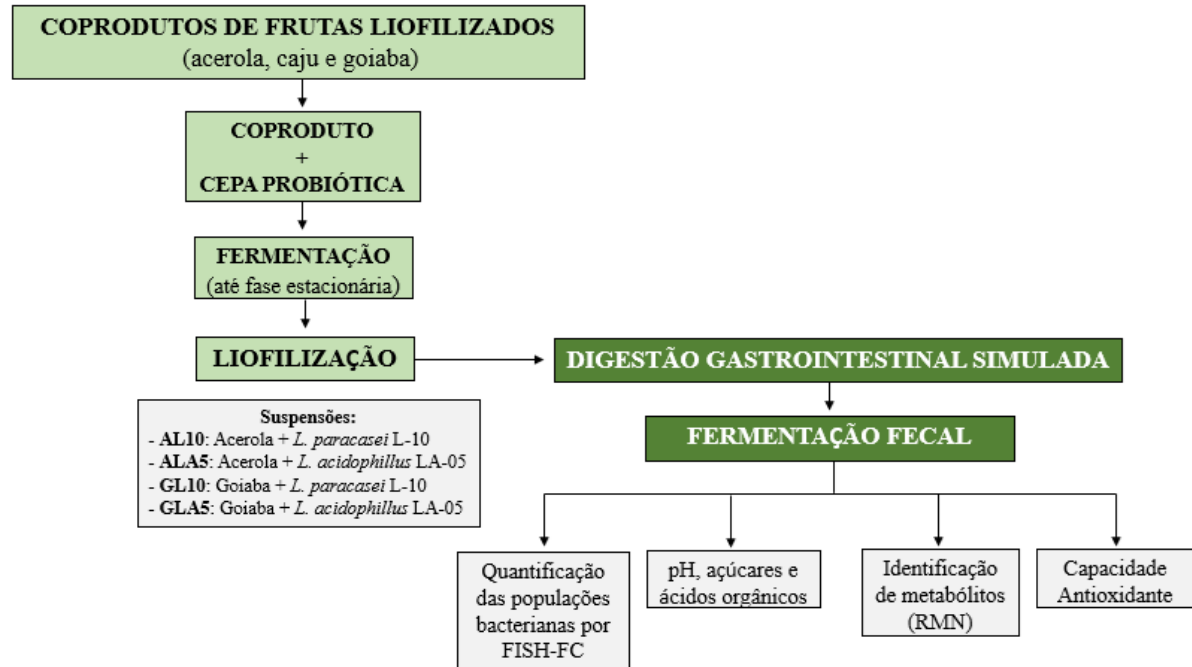
Esse estudo foi dividido em duas etapas. Na primeira etapa foi avaliado o potencial dos coprodutos de acerola, caju e goiaba como meio de cultivo de cepas de *Lactobacillus*, bem como o efeito crioprotetor dos coprodutos de frutas na culturabilidade das cepas probióticas após a liofilização, durante armazenamento refrigerado e digestão simulada *in vitro* (Figura 6). Na segunda etapa do experimento foram avaliados os efeitos na abundância relativa de diferentes populações bacterianas intestinais, produção de metabólitos microbianos e capacidade antioxidante durante fermentação fecal *in vitro* (Figura 7).

Figura 6. Delineamento experimental da primeira etapa do estudo.



Fonte: Próprio autor, 2024. CF, citometria de fluxo.

Figura 7. Delineamento experimental da segunda etapa do estudo.



Fonte: Próprio autor, 2024.

3.2 OBTENÇÃO E PREPARAÇÃO DOS COPRODUTOS DE FRUTAS

Os coprodutos de acerola (*Malpighia glabra* L.), caju (*Anacardium occidentale* L.) e goiaba (*Psidium guajava* L.) foram obtidos de empresas de processamento de frutas localizadas na cidade João Pessoa/PB. O processamento dos frutos seguiu os padrões e normas estabelecidos pelas empresas, gerando ao final do processo produtivo, um material denso e úmido, constituído principalmente de cascas, sementes, bagaço, e pequenas partes da polpa macerada. As amostras foram coletadas de vários lotes do processamento, totalizando, aproximadamente, 6 Kg de cada fruta, as quais foram colocadas assepticamente em sacos estéreis, e transportadas em caixas isotérmicas com gelo até o laboratório de Microbiologia e Bioquímica de Alimentos da Universidade Federal da Paraíba, *Campus I* – João Pessoa/PB, e posteriormente foram congelados ($-18 \pm 2^\circ\text{C}$). Em seguida, foram submetidos à liofilização a uma temperatura de $-55 \pm 2^\circ\text{C}$, com pressão de vácuo $<138 \mu\text{HG}$, velocidade de liofilização 1 mm/h, por aproximadamente 12 h, utilizando um liofilizador de bancada (marca LIOTOP, modelo L-101, São Carlos-SP, Brasil).

O material liofilizado foi triturado usando um liquidificador doméstico (PH900, Philco®, São Paulo, SP, Brasil), em baixa velocidade por 10 min e peneirado através de uma malha fina para obter um pó com um tamanho médio de partícula $<1,0$ mm. O pó liofilizado (Figura 8) foi armazenado em refrigerador (BRM45, Brastemp®, São Paulo, SP, Brasil) a $4 \pm 0,5$ °C, em sacos de polipropileno laminados comercialmente esterilizados até a realização das análises, que foram feitas em triplicata em três experimentos independentes.

Figura 8. Coprodutos de frutas liofilizados de acerola (A), caju (B) e goiaba (C), respectivamente.



Fonte: Próprio autor, 2024.

3.3 CARACTERIZAÇÃO DOS COPRODUTOS DE FRUTAS LIOFILIZADOS

3.3.1 Atividade de água e composição centesimal

As características físico-químicas dos coprodutos liofilizados de acerola, caju e goiaba seguiram os procedimentos descritos pela AOAC (2019). A atividade de água foi medida com um instrumento Aqualab (Novasina, Aqualab®, Série Modelo 3TE, EUA). O teor de umidade foi determinado por secagem em estufa estabilizada a 105 °C até obtenção de massa constante; o teor de cinzas (resíduo mineral fixo – RMF) foi quantificado por carbonização seguida de incineração em forno mufla (Jung®, modelo 0612, Blumenau, SC, Brasil) estabilizado a 550 °C. O teor de proteína foi determinado pelo método Kjeldahl, usando fator de 5,75 para converter nitrogênio em proteína. O conteúdo lipídico foi determinado utilizando o método Folch, Lees e Stanley (1957).

3.4 ENSAIOS DA UTILIZAÇÃO DOS COPRODUTOS COMO MEIO DE CULTIVO

3.4.1 Microrganismos, preparação dos meios de cultivo, condições e cinética de crescimento

Foram testadas duas cepas probióticas, *Lactobacillus acidophilus* LA-05 e *Lactocaseibacillus paracasei* L-10 (Araújo *et al.*, 2020; Duarte *et al.*, 2017) obtidas da Coleção de Microrganismos da Escola Superior de Biotecnologia, Universidade Católica do Porto (Porto, Portugal). Para a preparação do inóculo, cada cepa foi primeiramente cultivada anaerobicamente (Anaerogen System Anaerogen, Oxoid, Wade Road, Basingstoke, Reino Unido) em caldo de Man, Rogosa and Sharpe (MRS) a 37 ± 1 °C por 24 h, seguido de novo cultivo nas mesmas condições, até atingir a fase estacionária de crescimento (20 h – 24 h), conforme estudo anterior (Araujo *et al.*, 2020). Essas suspensões continham contagens de células viáveis de, aproximadamente, $10 \log$ UFC/mL (com leitura da densidade óptica (OD) a 625 nm (OD₆₂₅) correspondendo a 1,5).

Os coprodutos liofilizados foram suspensos individualmente em água (5%, p/v) (Quintana *et al.*, 2017), homogeneizados em Turratec (Tecnal, modelo TE-102, Piracicaba, São Paulo, Brasil) e autoclavados (Phoenix Luferco, AV 300, Araraquara, São Paulo, Brasil) por 15 min a 121 °C. Posteriormente, foram então utilizadas como meio de cultivo, a citar: CACE (acerola), CCAJ (caju) e CGOI (goiaba).

As cepas probióticas foram inoculadas individualmente em 100 mL de cada meio de cultivo descrito anteriormente em concentração de 2% (v/v), seguido de incubação a 37 ± 1 °C sob agitação (200 rpm). O caldo MRS (HiMedia, Mumbai, Índia) foi utilizado como controle, empregando-se as mesmas condições. O crescimento das cepas foi avaliado através da determinação da contagem de células viáveis e da aferição do pH (AOAC, 2019). Para a determinação da contagem de células viáveis, foram retiradas alíquotas de 100 µL de cada meio de cultivo contendo as cepas testes individualmente em diferentes intervalos de tempo (0, 6, 12, 20 e 24 horas) e foram realizadas diluições seriadas ($1:9$, 10^{-1} a 10^{-6}), utilizando solução salina esterilizada (NaCl 8.5 g/L), com posterior inoculação em ágar MRS (HiMedia) e incubação a 37 °C por 48 h em anaerobiose (Anaerobic System Anaerogen). Os resultados foram expressos em log unidades formadoras de colônias por mL (UFC/mL).

Para determinação do tempo de fase *lag* e da taxa de acidificação, os resultados de contagem de células viáveis e pH obtidos foram ajustados de acordo com a Equação 1 (Romano *et al.*, 2016):

$$pH(t) = \frac{pH_0 - pH_f}{1 + \frac{t^p}{c}} + pH_f \quad (1)$$

Onde t é o tempo em horas, pH_0 é o pH do meio de cultivo no tempo igual a 0, pH_f é o pH uma vez atingida a fase estacionária, c é o tempo correspondente ao ponto de inflexão e p é um fator de ajuste exponencial. A fase *lag* foi calculada como a interseção entre a linha tangente em $t=c$ e pH_0 . A taxa de acidificação durante a fase exponencial foi calculada como o módulo da inclinação da linha tangente.

3.4.2 Avaliação da atividade metabólica bacteriana durante fermentação

A atividade metabólica das cepas foi avaliada a partir da determinação dos teores de açúcares e ácidos orgânicos nos meios de cultivo em diferentes intervalos de fermentação [0 (imediatamente após a homogeneização), 12 e 20 h]. Já os teores de fibra solúvel e insolúvel, compostos fenólicos, determinação de atividade antioxidante e perfil metabólico global foram determinados nos intervalos de 0 (imediatamente após a homogeneização) e 20 h de fermentação.

3.4.2.1 Determinação dos açúcares, ácidos orgânicos e compostos fenólicos

Os teores de açúcares, ácidos orgânicos e compostos fenólicos foram determinados através de cromatografia líquida de alta eficiência usando cromatógrafo líquido (modelo 1260 Infinity LC, Agilent Technologies, St. Clara, CA, EUA) equipado com uma bomba de solvente quaternário (modelo G1311C), degaseificador, compartimento de coluna termostática (modelo G1316A) e amostrador automático (modelo G1329B) acoplado a um detector de matriz de diodos (DAD) (G1315D modelo) e detector de índice de refração (RID) (modelo G1362A).

Para determinação de açúcares e ácidos orgânicos, inicialmente alíquotas de 2 mL dos diferentes meios de fermentação foram centrifugadas ($4.000 \times g$, 15 min, 4 °C, centrífuga MPW-351R, MPW, Varsóvia, Polônia) e os sobrenadantes foram filtrados com filtro de 0,45 µm (Millex Millipore, Barueri, SP, Brazil). Foram utilizadas condições analíticas previamente descritas por Menezes *et al.* (2021a). Os resultados foram expressos em gramas de açúcares ou de ácidos orgânicos por litro de meio de cultivo (g/L).

Para determinação dos compostos fenólicos, alíquotas de 5 mL dos diferentes meios de cultivo foram retiradas e homogeneizadas com 5 mL de metanol a 80% (Sigma-Aldrich, St.

Louis, MO, USA) e, em seguida, foram centrifugados ($9000 \times g$, 15 min, 4 °C) e os sobrenadantes foram filtrados em filtro de 0,45 μm (Millex Millipore). Foram empregadas as condições analíticas previamente descritas por Dutra *et al.* (2018) e Padilha *et al.* (2017). Os resultados foram expressos em mg de fenólicos por litro de meio de cultivo (mg/L).

3.4.2.2 Determinação do conteúdo de fibras

A determinação dos conteúdos de fibras dietéticas solúveis e insolúveis foi realizada segundo a metodologia descrita por Prosky *et al.* (1992), com adaptações, utilizando um kit de ensaio enzimático-gravimétrico (TDF 100A, Sigma Aldrich®, St. Louis, MA, EUA).

3.4.2.2.1 Fibras insolúveis

Para tanto, 1 g de amostra de cada meio de cultivo foi pesada em balança semi-analítica (Marte®, modelo AD200, São Paulo-SP, Brasil) em triplicata (diferença entre pesos <20 mg) em béqueres. Foi adicionado 40 mL de solução MES-TRIS (pH 8,2), seguido da verificação e ajuste do pH 6,0 ($\pm 0,2$), adicionando-se solução de NaOH a 0,275 N (ou HCl 0,325 N). Posteriormente, foram adicionados 100 μL de solução de enzima α -amilase termoresistente (Termamyl, Sigma-Aldrich A-3306). Os béqueres contendo as amostras foram cobertos com papel alumínio e colocados em banho ultratermostatizado (Splabor®, SP-152/10, Presidente Prudente, SP, Brasil) a 100 °C durante 30 minutos (agitados manualmente em intervalos de 5 minutos ao longo da incubação). As amostras foram resfriadas até temperatura ambiente (25 ± 2 °C), tendo o pH ajustado para 7,5 com solução NaOH a 0,275 N. Adicionaram-se 100 μL de solução enzimática de protease (Sigma-Aldrich® P-3910) (50 mg de protease em 1 mL de tampão fosfato) em cada amostra. Os béqueres contendo as amostras foram cobertos com papel alumínio e incubados em banho-maria (SP-152/10, Splabor®, Presidente Prudente, SP, Brasil) com agitação contínua a 60 °C, durante 30 minutos. Após a solução esfriar, verificou-se o pH, sendo então ajustado para pH 4,0-4,6 com solução de HCl a 0,325 N, e, em seguida, adicionaram-se 300 μL de amiloglicosidase (Sigma-Aldrich® A-9913). As soluções foram novamente levadas para banho ultratermostatizado (Splabor®) com agitação contínua a 60 °C por 30 minutos.

Para a análise das fibras insolúveis, a solução foi filtrada quantitativamente em cadinho especial (cadinho de vidro sinterizado contendo celite, previamente incinerado em mufla e tarado), conectado com sistema de vácuo com balão Kitassato. Os béqueres contendo as

amostras foram lavados com três porções de 20 mL de álcool etílico 78% (Dinâmica[®], Ribeirão Preto-SP, Brasil), colocando todo o resíduo no cadinho vagarosamente, seguido por mais uma lavagem com três porções de 20 mL de álcool etílico (Dinâmica[®]) a 95%. Por fim, os béqueres foram lavados com duas porções de 20 mL de acetona P.A. (Dinâmica[®], Ribeirão Preto-SP, Brasil). O filtrado foi reservado para análise de fibras solúveis. Os cadinhos de vidro foram transferidos para estufa de secagem e esterilização (Fanem[®], 320-SE, São Paulo, Brasil) a 105 °C e mantidos *overnight*, depois resfriados em dessecador durante 30 minutos e pesados em balança semi-analítica (Marte[®], modelo AD200, São Paulo-SP, Brasil).

Os dados foram aplicados em cálculos para a correção do branco e para a determinação das fibras insolúveis conforme as equações 2 e 3, respectivamente, adaptadas de Freitas *et al.* (2008).

$$\text{Correção do branco} = (P2bi - P1bi) - PTNbi - CZbi \quad (2)$$

$$\text{Fibra Alimentar Insolúvel} = \frac{(P2i - P1i) - PTNi - CZi - CBi}{PAi} \times 100 \quad (3)$$

Onde, “P2bi” é o número de gramas do cadinho de resíduo de branco; “P1bi”, é número de gramas cadinho branco tarado; “PTNbi” é o teor de proteína calculado para o branco; “CZbi” é o teor de cinzas obtidas do branco; “P2i” é o número de gramas do cadinho de resíduo da amostra; “P1i”, é número de gramas do cadinho da amostra tarado; “PTNi” é o teor de proteína calculado para a amostra; “CZi” é o teor de cinzas obtidas da amostra; “CBi” é a correção do branco e “PAi” é o peso (média) da amostra em gramas. A correção do branco foi expressa em gramas e o resultado das fibras insolúveis foi expressa por 100 g de amostra.

3.4.2.2.2 Fibras solúveis

Para a análise de fibras solúveis, o material filtrado (obtido na etapa de determinação de fibra insolúvel) foi transferido para béqueres, em triplicata, sendo feita a adição de etanol (Dinâmica[®]) a 95% (aproximadamente 4 vezes o volume do líquido). A mistura foi deixada em repouso sob temperatura ambiente (25 ± 2 °C) por 12 a 16 horas. A solução foi filtrada quantitativamente em cadinho especial (cadinho de vidro sinterizado contendo celite, previamente incinerado em mufla e tarado), conectado com sistema de vácuo com balão Kitassato. Os béqueres contendo as amostras foram lavados com três porções de 20 mL de

etanol a 78% (Dinâmica[®], Ribeirão Preto-SP, Brasil), colocando todo o resíduo no cadinho vagarosamente, seguido por mais uma lavagem com três porções de 20 mL de álcool etílico (Dinâmica[®]) a 95%. Por fim, os béqueres foram lavados com duas porções de 20 mL de acetona P.A. (Dinâmica[®], Ribeirão Preto-SP, Brasil). Após filtração, os cadinhos de vidro foram transferidos para estufa de secagem e esterilização (Fanem[®], 320-SE, Mogi Mirim-SP, Brasil) a 105 °C, onde foram mantidos *overnight*, seguido por resfriamento em dessecador durante 30 minutos e pesagem em balança semi-analítica (Marte[®], modelo AD200, São Paulo-SP, Brasil).

Os dados foram aplicados em cálculos para a correção do branco e para a determinação das fibras solúveis conforme as equações 4 e 5, respectivamente, adaptadas de Freitas *et al.* (2008).

$$\text{Correção do branco} = (P2bs - P1bs) - PTNbs - CZbs \quad (4)$$

$$\text{Fibra Alimentar Solúvel} = \frac{(P2s - P1s) - PTNs - CZs - CBs}{PAs} \times 100 \quad (5)$$

Onde, “P2bs” é o número de gramas do cadinho de resíduo de branco; “P1bs”, é número de gramas cadinho branco tarado; “PTNbs” é o teor de proteína calculado para o branco; “CZbs” é o teor de cinzas obtidas do branco; “P2s” é o número de gramas do cadinho de resíduo da amostra; “P1s”, é número de gramas do cadinho da amostra tarado; “PTNs” é o teor de proteína calculado para a amostra; “CZs” é o teor de cinzas obtidas da amostra; “CBs” é a correção do branco e “PAs” é o peso (média) da amostra em gramas. A correção do branco foi expressa em gramas e o resultado das fibras solúveis foi expressa por 100 g de amostra.

3.4.2.2.3 Fibra alimentar total

O teor de fibra alimentar total foi realizado por meio da somatória dos teores de fibra insolúvel e fibra solúvel sendo o resultado expresso por 100 g de amostra (Equação 6).

$$\text{Fibra alimentar total} = \text{fibra alimentar insolúvel} + \text{fibra alimentar solúvel} \quad (6)$$

3.4.2.3 Determinação da atividade antioxidante

A capacidade antioxidante por meio da eliminação do radical DPPH (2,2-difenil-1-picril-hidrazil), assim como a capacidade antioxidante equivalente a trolox por meio da captura do radical 2,2-azino-bis(3-etilbenzotiazolina)-6-ácido sulfônico (ABTS^{•+}) foi realizado conforme Nascimento D. *et al.* (2022), com algumas modificações. O poder antioxidante para a redução do complexo TPTZ (2,4,6-tri(2-piridil)-1,3,5-triazina) com Fe³⁺ no ensaio de FRAP foi realizado de acordo com Paula *et al.* (2022), com pequenas modificações.

3.4.2.3.1 Obtenção do extrato

A obtenção do extrato se deu por meio de hidrólise ácida seguindo metodologia adaptada de Massa *et al.* (2020). Aliquotas de 2 mL dos diferentes meios de fermentação foram diluídas em 10 mL da solução extratora de etanol a 70% (70:30, v/v) e ajustado o pH em 2 com HCl a 1 M em tubo Falcon de 50 mL. Em seguida, o tubo foi envolto em papel alumínio para abrigo da luz e armazenado sob refrigeração ($4 \pm 0,5$ °C) por 24 horas. O conteúdo foi levado para uma centrífuga refrigerada (MPW-351R, MPW[®], Varsóvia, Polônia) e centrifugado ($1696 \times g$, 10 minutos, 4 °C) e o sobrenadante foi utilizado para as análises.

3.4.2.3.2 Atividade Antioxidante *in vitro* - Método FRAP (*Ferric reducing ability of plasma*)

O reagente FRAP foi preparado somente no momento da análise, utilizando uma mistura de 25 mL de tampão acetato (0,3M, pH 3,6), 2,5 mL de solução TPTZ (10 mM em HCl a 40 mM) e 2,5 mL de solução aquosa de cloreto férrico a 20 mM em 50 mL de água destilada, na proporção 100:10:10. Para a análise foram elaboradas diferentes diluições do extrato, onde retiraram-se 45 µL de cada uma e acrescentaram-se 135 µL de água destilada, seguido da adição de 1,35 mL do reagente FRAP. Realizou-se homogeneização em agitador de tubos tipo Vortex (Tecnal[®]) e a mistura foi incubada em banho ultratermostatizado (Splabor[®]) a $37 \pm 0,5$ °C por 30 minutos no escuro.

A solução “branca” foi o próprio reagente FRAP. Transferiu-se 250 µL em uma microplaca de 96 poços e foi feita a leitura em comprimento de onda de 595 nm usando um espectrofotômetro BioTek Eon (Winooski, VT, USA), para medir a redução do complexo TPTZ (2,4,6-tri(2-piridil)-1,3,5-triazina) com Fe³⁺. A atividade antioxidante foi calculada usando uma curva de sulfato ferroso 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 ($\mu\text{mol FeSO}_4/\text{g}$).

3.4.2.3.3 Atividade Antioxidante *in vitro* - Método ABTS^{•+} (ácido 2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic)

O radical ABTS^{•+} foi formado por meio da reação da solução ABTS⁺ a 7 mM com a solução de persulfato de potássio a 140 mM, que foram incubados em temperatura de 25 ± 1 °C no escuro durante 16 horas. Após a formação do radical, foi realizada a diluição em álcool etílico absoluto até obter o valor de absorbância de $0,70 \pm 0,05$ nm a 734 nm. Para a análise, foram elaboradas diferentes diluições do extrato, onde transferiram-se 50 μL de cada diluição em uma microplaca de 96 poços e acrescentaram-se 250 μL do radical ABTS^{•+}. O controle foi a mistura da solução extratora (50 μL) e o radical ABTS^{•+} (250 μL). Para o branco foi utilizada apenas a solução extratora (300 μL). As amostras foram mantidas na ausência de luz por 6 minutos e feita a leitura da absorbância em comprimento de onda de 734 nm, usando espectrofotômetro BioTek Eon (Winooski, VT, USA) para medir a diminuição na concentração do radical livre ABTS^{•+}. A atividade antioxidante foi calculada usando uma curva padrão de Trolox a 2 mM (50-2000 μM) e os resultados foram expressos em μmol de capacidade antioxidante equivalente ao Trolox (CAET) por grama de amostra ($\mu\text{mol CAET/g}$).

3.4.2.3.4 Atividade Antioxidante *in vitro* - Método DPPH (2,2-difenil-1-picril-hidrazil)

Elaborou-se uma solução estoque de DPPH[•] (24 mg diluído em 100 mL de álcool etílico absoluto), da qual foi preparada a 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. Para a análise, foram elaboradas diferentes diluições do extrato, onde retiraram-se 50 μL de cada uma e acrescentaram-se 1950 μL da solução de trabalho de DPPH[•]. Em seguida, realizou-se homogeneização em agitador de tubos tipo Vortex (AP-56/1, Technal[®], São Paulo, Piracicaba, Brasil) e a mistura foi mantida sob repouso por 30 minutos em temperatura ambiente ($25 \pm 0,5$ °C) no escuro. O controle foi a mistura da solução extratora (50 μL) e solução de trabalho de DPPH[•] (1.950 μL). Para o branco foi utilizado apenas a solução extratora (250 μL). Transferiram-se 250 μL para uma microplaca de 96 poços e foi feita a leitura em comprimento de onda de 515 nm usando um espectrofotômetro BioTek Eon (Winooski, VT, USA), para medir a diminuição na concentração do radical livre DPPH[•]. A

atividade antioxidante foi calculada e os resultados foram expressos em μmol de capacidade antioxidante equivalente ao Trolox (CAET) por grama de amostra ($\mu\text{mol CAET/g}$).

3.4.2.4 Perfil metabólico global

O perfil metabólico global dos meios de cultivo foi analisado por Ressonância Magnética Nuclear (RMN). Uma alíquota de 550 μL de cada meio de cultivo fermentado foi diluída com 50 μL de óxido de deutério com 0,01% de TSP (sal de sódio do ácido tetrametilsililpropanóico- d_4), e colocada em um tubo para análise de Ressonância Magnética Nuclear (RMN) de 5 mm de diâmetro. Os experimentos de RMN foram realizados em um equipamento Bruker Ascend 400 operando a 400 MHz para ^1H -NMR e a 100 MHz para ^{13}C -NMR (Bruker, Billerica, MA, EUA). Os seguintes parâmetros foram usados para obter a sequência do espectro: noesygppr1d; temperatura: 26 °C; número de varreduras: 32; varredura dummer: 4; ganho do receptor: 58.8; tempo de aquisição: 4,08 s. Os espectros de RMN foram submetidos a referenciamento, correção de linha de base, correção de fase, alinhamento, remoção do pico de água em 5,07-4,60 ppm para normalização pela área total do espectro, e obtenção do espectro de binning com uma faixa de 0,00 a 9,00 ppm e com compartimentos de 0,020 ppm. Os espectros foram processados usando o software Bruker TopSpin 4.1.1 (Sampaio *et al.*, 2022).

3.5 AVALIAÇÃO DOS COPRODUTOS FERMENTADOS COM PROBIÓTICOS

3.5.1 Viabilidade das cepas probióticas após liofilização e durante o armazenamento

Alíquotas de 1 mL dos diferentes meios de cultivo dos coprodutos de frutas (CACE, CCAJ e CGOI) contendo *L. acidophilus* LA-05 ou *L. paracasei* L-10 na fase estacionária (após 20 h de fermentação, esse tempo foi determinado a partir de estudos anteriores) (Araujo *et al.*, 2020) foram neutralizadas com hidróxido de sódio (NaOH) a 0,1M até pH 7 e transferidas para frascos de vidro de 5 mL sob condições assépticas. Já os microrganismos cultivados em MRS (controle), foram neutralizados e ressuspensos em tampão fosfato salino (PBS 0,1 M; pH 7,4) (Quintana *et al.*, 2017). Em seguida, os meios de cultivo [CACE, CCAJ, CGOI e controle (MRS)] fermentados pelas cepas de *Lactobacillus* foram congelados (-80 °C por 48 h) e liofilizados (temperatura de -55 ± 2 °C, com pressão de vácuo <138 μHG , taxa de liofilização

de 1 mm/h), por aproximadamente 40 h usando liofilizador de bancada (LIOTOP[®]) (Garcia *et al.*, 2018).

As cepas liofilizadas foram mantidas em dessecadores contendo sílica gel e armazenadas sob temperatura de refrigeração ($4 \pm 0,5$ °C) por 120 dias (Araujo *et al.*, 2020; Sampaio *et al.*, 2021). Após a liofilização, nos tempos 0 (imediatamente após a secagem), 30, 60 e 120 dias de armazenamento refrigerado, foram determinadas as contagens de células viáveis das cepas de *Lactobacillus*. Para isso, as cepas foram reidratadas em água destilada esterilizada (1:9) por 15 minutos. Em seguida, diluições seriadas (1:9, 10^{-1} a 10^{-6}) foram realizadas utilizando solução salina esterilizada (NaCl, 8.5 g/L), e alíquotas de 10 µL foram semeadas em placas contendo ágar MRS (HiMedia) utilizando-se a técnica de inoculação em microgota (Herigstad; Hamilton; Heersink, 2001). As placas foram incubadas (37 °C/48 h) anaerobicamente (Anaerobic System Anaerogen, Oxoid). Os resultados foram expressos em log UFC/mL.

Em adição foram calculas as taxas de sobrevivência, após a liofilização, utilizando a equação descrita abaixo, conforme estudo prévio (Bagad *et al.*, 2017).

$$\text{Taxa de sobrevivência (\%)} = \frac{\text{UFC após a liofilização}}{\text{UFC antes da liofilização}} \times 100\% \quad (8)$$

3.5.2 Viabilidade das cepas probióticas durante a digestão gastrointestinal simulada

As cepas liofilizadas nos meios de cultivo foram submetidas a digestão simulada *in vitro*, imediatamente após a liofilização (1º dia) e ao final do armazenamento refrigerado (120 dias), seguindo procedimentos descritos por Albuquerque *et al.* (2017). As cepas liofilizadas foram reidratadas com água destilada esterilizada ($25 \pm 0,5$ °C, 10 min.). A condição bucal foi simulada empregando 100 U/mL de α -amilase diluída em CaCl₂ a 1 mM e pH ajustado para 6,9 com NaHCO₃ a 1 M (tempo de exposição de 2 min, com agitação de 200 rpm). A fase estomacal foi simulada usando 25 mg de pepsina diluída em 1 mL de HCl a 0,1 M (proporção 0,05 mL/mL da amostra, tempo de exposição 120 min, 37 °C, 130 rpm). A fase intestinal foi mimetizada com 2 g de pancreatina/L de NaHCO₃ a 0,1 M e 12 g de sais biliares bovinos/L de NaHCO₃ a 0,1 M, pH ajustado para 6,0 (proporção 0,25 mL/mL da amostra, tempo de exposição 120 min, 37 °C, 45 rpm). Foi utilizada agitação mecânica para simular movimentos peristálticos em incubadora (TECNAL TE-424, São Paulo, Brasil) a $37 \pm 0,5$ °C, com ajuste de rotação em cada fase. Os reagentes, enzimas e sais biliares bovinos foram adquiridos da Sigma-Aldrich[®]. Após

cada condição gastrointestinal simulada, foram determinadas as contagens de células viáveis. Para tanto, alíquotas de 100 µL foram diluídas em série [1:9 (v/v), 10^{-1} – 10^{-6}] em solução salina esterilizada (NaCl, 8,5 g/L) e semeadas em placas contendo ágar MRS (HiMedia) usando técnica de microgota (Herigstad; Hamilton; Heersink, 2001). As placas foram incubadas anaerobicamente (Anaerobic System Anaerogen, Oxoid) a 37 °C durante 48 h, e os resultados das contagens foram expressos como log UFC/mL.

3.5.3 Avaliação do estado fisiológico da célula bacteriana após a liofilização e durante a digestão gastrointestinal simulada

A citometria de fluxo (CF) foi usada para monitorar os aspectos estruturais das células de *Lactobacillus* liofilizadas nos diferentes meios de cultivo, logo após a liofilização e com 120 dias de armazenamento refrigerado, e durante a digestão gastrointestinal simulada (conforme descrito anteriormente) (Albuquerque *et al.*, 2017).

3.5.3.1 Procedimento de coloração

As amostras das diferentes etapas (armazenamento e digestão simulados) foram reidratadas com 1 mL de água destilada esterilizada e filtradas utilizando um filtro de seringa 1,0 µm (PVDF, Analítica, São Paulo, SP, Brasil) estéril com fibra de vidro de poro 0,45 µm (Whatman®). Em seguida, centrifugou-se ($4500 \times g$, 10 minutos, 4 °C) e os sedimentos obtidos foram lavados duas vezes, ressuspensos em solução salina esterilizada tamponada com fosfato (SSTF) e submetidos ao procedimento de coloração com iodeto de propídio (PI, Sigma-Aldrich®) na concentração de 10 µg/mL, para avaliar a integridade de membrana e diacetato de carboxifluoresceína (cFDA, Sigma-Aldrich®) na concentração de 2,5 µg/mL, para determinação da atividade metabólica celular (Gandhi; Shah, 2015; Sträuber; Müller, 2010).

As amostras submetidas à dupla coloração foram incubadas por 15 minutos em local escuro. Em seguida, estas suspensões foram centrifugadas ($4500 \times g$, 10 min, 4 °C) e lavadas em igual volume de SSTF a fim de remover o excesso dos fluorocromos. Finalmente, foram ressuspensas em SSTF e foi realizada a leitura no citômetro (BD Accuri C6, Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ, EUA). As células das cepas teste quando expostas ao primeiro dia de armazenamento (dia 1 – após a liofilização e com 120 dias de armazenamento) e nas diferentes condições gastrointestinais simuladas (boca, estômago e intestino) (Pedrosa *et al.*, 2020; Paparella *et al.*, 2008).

3.5.3.2 Análises em citometria de fluxo

As análises foram realizadas com uso de 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 $\pm$ 30 nm e foi utilizado para coletar fluorescência na cor verde, a fim de 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, a fim de verificar marcações com PI. Os níveis do limiar para aquisição de dados foram definidos com os detectores de dispersão de luz. Na dispersão direta (*forward scatter*, FSC) foi utilizado o valor de 30000 e na dispersão lateral (*side scatter*, SSC) foi utilizado o valor de 12000 com o intuito de eliminar partículas muito menores do que as células intactas e delimitar as células bacterianas, respectivamente.

Cada aquisição de amostra foi feita com uma configuração de baixa taxa de fluxo (12 mL/minuto) e um total de 10.000 eventos foram analisados por amostra. Foi utilizada uma compensação automática para os dados obtidos. A análise dos dados foi realizada com o software BD Accuri C6 (Becton Dickinson and Company) (de Souza Pedrosa *et al.*, 2020; Paparella *et al.*, 2008).

3.5.3.3 Interpretação dos resultados

Os gráficos de densidade indicando FSC no eixo Y *versus* SSC no eixo X foram projetados para identificar a população bacteriana de interesse. O parâmetro FSC fornece informações relativas ao tamanho da célula, enquanto o parâmetro SSC fornece informações sobre a granulosidade celular. Para analisar os dados de dupla marcação foram projetados gráficos de densidade FL1 no eixo Y *versus* FL3 no eixo X. Os gráficos FL1 *versus* FL3 foram demarcados com quatro quadrantes, sendo um para cada subpopulação celular de acordo com a fluorescência detectada nas leituras, a saber: Para a coloração dupla com PI e cFDA, as subpopulações caracterizadas como PI⁻cFDA⁺ localizadas no quadrante superior esquerdo corresponderam ao percentual de células com membrana intacta e com atividade enzimática (células vivas); as subpopulações caracterizadas como PI⁺cFDA⁻ localizadas no quadrante inferior direito corresponderam ao percentual de células com membranas permeabilizadas e sem atividade metabólica (células mortas); as subpopulações celulares caracterizadas como

PI⁺cFDA⁺ localizadas no quadrante superior direito foram consideradas células permeabilizadas com atividade enzimática (células lesadas) (Paparella *et al.*, 2008). Como controles positivos foram utilizadas suspensões de células das amostras que não foram submetidas ao processo de marcação. Como controle negativo foram utilizadas suspensões de células das amostras incubadas em etanol para promover morte celular. Ambos os controles foram lavados duas vezes com solução salina esterilizada tamponada com fosfato por meio de centrifugação ($4500 \times g$, 10 minutos, 4 °C).

3.6 FERMENTAÇÃO FECAL *IN VITRO* DOS COPRODUTOS FERMENTADOS COM PROBIÓTICOS

3.6.1 Aspectos éticos da pesquisa

A presente pesquisa atende aos padrões éticos exigidos pela Resolução nº 466 de 12 de dezembro de 2012 (CNS-MS, 2012), que aprova as diretrizes e normas regulamentadoras de pesquisas envolvendo seres humanos e estabelece que "toda pesquisa envolvendo seres humanos deverá ser submetida à apreciação de um Comitê de Ética em Pesquisa". Os indivíduos participantes da pesquisa foram esclarecidos acerca da temática da pesquisa e em seguida, assinaram um Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (APÊNDICE A) antes do início dos experimentos. O protocolo experimental foi aprovado sob o número 6.080.926, de acordo com o parecer consubstanciado (ANEXO A).

3.6.2 Coleta das amostras fecais

As amostras fecais frescas foram doadas por seis voluntários adultos saudáveis, sendo três homens e três mulheres, com idade entre 28 e 33 anos. Como critérios de inclusão, os doadores deveriam seguir uma dieta onívora, sem precedentes de doença no intestino grosso, sem fazer o uso de alimentos probióticos ou prebióticos concentrados, além de não ter feito uso de antibióticos ou qualquer outro medicamento de uso controlado por, pelo menos, seis meses antes da coleta (Albuquerque *et al.*, 2021; Rodrigues *et al.*, 2016; Sampaio *et al.*, 2022). Um kit para coleta foi disponibilizado para cada doador, contendo frascos coletores esterilizados, luvas, máscara, prato e espátula descartável, além de álcool 70%, sendo estes instruídos quanto ao manuseio asséptico das amostras.

As amostras foram coletadas em até 30 min após a excreção, sendo transportadas em jarra de anaerobiose (Anaerobar, Oxoid, Basingstoke, Inglaterra) contendo gerador de gás anaeróbico (AnaeroGen) e utilizadas imediatamente (Albuquerque et al., 2021; Menezes *et al.*, 2021a; Menezes *et al.*, 2021b;).

3.6.3 Simulação da digestão gastrointestinal

Após a liofilização dos coprodutos fermentados (conforme seção 3.5.1), as suspensões denominadas na Tabela 1, passaram pelo processo de digestão simulado, descrito na seção 3.5.2. Os fluídos resultantes da digestão simulada dos nutracêuticos passaram pelo processo de diálise para a retirada de produtos digestivos de baixo peso molecular (monossacarídeos livres), simulando condições de absorção das células no intestino. Para tanto, os fluídos foram transferidos para um tubo de diálise de celulose regenerada de 1 kDa de peso molecular (Spectra/Por 6, Spectrum Europe, Holanda) e dialisados contra solução de NaCl a 0,01M a $5 \pm 0,5$ °C. Após 18 horas, os fluidos de diálise foram substituídos e o processo continuado por um período adicional de 2 horas. Os fluídos dialisados foram liofilizados novamente e armazenadas até sua utilização na fermentação colônica, por até no máximo uma semana.

Tabela 1 – Suspensões utilizadas para fermentação fecal.

Código	Suspensões
AL10	Coproducto de acerola + <i>L. paracasei</i> L-10
ALA5	Coproducto de acerola + <i>L. acidophilus</i> LA-05
GL10	Coproducto de goiaba + <i>L. paracasei</i> L-10
GLA5	Coproducto de goiaba + <i>L. acidophilus</i> LA-05

3.6.4 Preparação do inóculo fecal e do meio de fermentação fecal *in vitro*

As amostras fecais frescas coletadas de cada doador foram misturadas em igual quantidade (1:1:1:1:1:1), diluídas (1:10 p/v) em tampão fosfato salino (PBS 0,1 M; pH 7,4), esterilizadas e homogeneizadas por 2 minutos sob agitação (200 rpm). Em seguida, foram filtradas com o uso de uma camada tripla de gazes esterilizadas para remoção de partículas

grandes e armazenadas ($37 \pm 0,5$ °C) em frascos esterilizados sob condições anaeróbicas (AnaeroGen).

Para o processo de fermentação foi formulado 1 L de meio de crescimento, com a seguinte composição: 4,5 g de NaCl, 4,5 g de KCl, 1,5 g de NaHCO₃, 0,69 g de MgSO₄, 0,8 g de L-cisteína, 0,5 g de KH₂PO₄, 0,5 g de K₂HPO₄, 0,4 g de sal biliar, 0,08 g CaCl₂, 0,005 g de FeSO₄, 1 mL de Tween 80 e 4 mL de solução de resazurina (0,025%, v/v) como indicador anaeróbio, diluído em água destilada e esterilizado por autoclavagem (121 °C, 1 atm, 15 min). Culturas descontínuas de fermentação (40 mL) foram formuladas com 40% de meio de crescimento (v/v), 40% do inóculo fecal humano (v/v) e as amostras 20 % digeridas e liofilizadas (CAL10, CALA5, CGLA10 e CGLA5), seguido por incubação sob anaerobiose (AnaeroGen) por 48 horas a 37 °C (Menezes *et al.*, 2021a; Menezes *et al.*, 2021b). Para compor o experimento também foi preparado um meio fermentativo com FOS (20% p/v) (Gibson *et al.*, 2017; Sanders *et al.*, 2019) e um meio sem adição de substrato fermentável, para serem testados como controles positivos (FOS) e negativos (NC), respectivamente (Guergoletto *et al.*, 2016; Rodrigues *et al.*, 2016). Os ingredientes utilizados para formular os meios foram obtidos da Sigma-Aldrich® (Rodrigues *et al.*, 2016).

3.6.5 Quantificação das populações bacterianas nos sistemas de fermentação fecal com hibridização por fluorescência *in situ* (FISH) e citometria de fluxo (CF)

A técnica FISH com sondas oligonucleotídicas selecionadas e projetadas para atingir regiões específicas do gene 16S rRNA de diferentes grupos microbianos combinada com CF foi utilizada para avaliar a capacidade das amostras digeridas (CAL10, CALA5, CGLA10 e CGLA5) em modular a microbiota intestinal humana em sistemas de fermentação fecal *in vitro* (Conterno *et al.*, 2019; Menezes *et al.*, 2021a; Menezes *et al.*, 2021b). Foram utilizadas cinco diferentes sondas (Tabela 2) (Bif 164 específica para *Bifidobacterium*, Lab 158 específica para *Lactobacillus* e *Enterococcus*, Bac 303 específica para *Bacteroides* e *Prevotella*, Erec 482 específica para *Eubacterium rectal* e *Clostridium coccoides* e Chis 150 específica para *Clostridium histolyticum*) sintetizadas comercialmente e marcadas com o corante fluorescente Cy3 (Sigma-Aldrich®) (Albuquerque *et al.*, 2021; Rodrigues *et al.*, 2016; Menezes *et al.*, 2021a; Menezes *et al.*, 2021b). O marcador SYBR Green (Molecular Probes, Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA) foi usado para enumerar a população total de bactérias por meio da marcação da fita dupla de DNA (Albuquerque *et al.*, 2021; Conterno *et al.*, 2019).

Ao término de cada período de fermentação, as amostras foram tomadas e submetidas ao processo de fixação a fim de estabilizar as estruturas celulares. No tempo zero (logo após a homogeneização dos componentes do meio de fermentação) e após 24 e 48 horas de fermentação, alíquotas de 375 μL das culturas foram fixadas *overnight* a 4 °C com 1125 μL de solução de paraformaldeído filtrada (4%, p/v) para estabilizar a estrutura celular. Após esse período, as alíquotas foram centrifugadas ($10000 \times g$, 5 min, 4 °C), lavadas duas vezes ($10000 \times g$, 5 min, 4 °C) com PBS a 1 M, ressuspensas em 300 μL de PBS: etanol 99% (1:1 v/v), filtradas com filtro de membrana tamanho de poro 0,45 μm (Whatman®) e armazenadas a -20 °C.

Para a realização da hibridização *in situ*, 10 μL das células fixadas foram ressuspensas em 190 μL de PBS 1X (Gibco, Gaithersburg, EUA; pH 7.2), centrifugadas ($4000 \times g$, 15 min, 4 °C), descartando o sobrenadante, ressuspensas em 200 μL de tampão Tris-EDTA (100 mM Tris-HCl and 50 mM EDTA; pH 8) e centrifugadas ($4000 \times g$, 15 min, 4 °C). As amostras foram tratadas com 200 μL de Tris-EDTA contendo lisozima (1 mg/mL) e incubadas por 10 minutos no escuro em temperatura ambiente ($25 \pm 0,5$ °C) para permeabilizar as células que receberam as sondas Lab 158 e Bif 164, seguindo por centrifugação ($4000 \times g$, 15 min, 4 °C). As amostras foram ressuspensas em 45 μL de tampão de hibridização [NaCl a 0,9 M, Tris-HCl (pH 7,5) a 20 mM, 0,1% (p/v) de dodecil sulfato de sódio (DSS)] e com 5 μL de sonda oligonucleotídica fluorescente (50 ng/ μL) e mantidas sob temperatura de hibridização apropriada para cada sonda (45 ou 50 °C) no escuro por 4 horas.

Tabela 2 - Sondas de oligonucleotídeos de rRNA 16S e condições de hibridização utilizadas nas análises com hibridização *in situ* fluorescente acoplada a citometria de fluxo.

Sonda	Especificidade	Temperatura de lavagem e hibridização (°C)
Bac 303	<i>Bacteroides – Prevotella</i>	45 °C
Bif 164	<i>Bifidobacterium</i>	50 °C
Chis 150	<i>Clostridium Histolyticum</i>	50 °C
Erec 482	<i>Clostridium coccoides-</i> <i>Eubacterium Rectale</i>	50 °C
Lab 158	<i>Lactobacillus</i> spp. - <i>Enterococcus</i> spp.	50 °C
Rfla 729	<i>Ruminococcus albus/R. flavefaciens</i>	50 °C

Após essa etapa, as amostras foram centrifugadas ($4000 \times g$, 15 min, 25 °C), ressuspensas em 200 μL de tampão de hibridização sem DSS e mantidas sob temperatura de lavagem apropriada para cada sonda (45 ou 50 °C) no escuro por 30 minutos para retirar sondas não ligadas. As amostras foram centrifugadas ($4000 \times g$, 15 min, 25 °C), ressuspensas em 200 μL de PBS 1X e 20 μL de SYBR Green (1:1000 solução estoque diluída em dimetil sulfóxido $\geq 99.9\%$, Sigma-Aldrich®), incubadas por 10 minutos no escuro sob temperatura ambiente ($25 \pm 0,5$ °C), centrifugadas ($4000 \times g$, 15 min, 25 °C) e ressuspensas com 200 μL de PBS 1X.

Uma amostra em branco (sem a sonda oligonucleotídica e sem SYBR Green), e uma amostra marcada somente com SYBR Green, foram preparadas para todas as amostras, seguindo os mesmos passos das amostras hibridizadas, como um controle para definir o limiar das comportas do citômetro de fluxo (BD Accuri C6, New Jersey, EUA), o que permite revelar a potencial autofluorescência das amostras, excluindo os falsos positivos. Na análise de CF, os sinais fluorescentes das células individuais passam através de uma zona de laser, sendo coletados como sinais logarítmicos. Os sinais fluorescentes (mensuramento da área de pulso) foram coletados pelos canais FL1 (SYBR Green) e FL2 (Lab 158, Bif 164, Bac 303, Chis 150 e Erec 482). A aquisição das amostras foi configurada para passar em um baixo fluxo, com nível limite para dispersão direta (FSC) ajustado para 30.000 e com total de 10.000 eventos coletados para cada amostra. Os citogramas de emissão de fluorescência foram registrados com o software BD Accuri C6 (Becton Dickinson and Company). Os resultados foram expressos como abundância (porcentagem relativa) de células hibridizadas com cada sonda Cy3 específica de grupo bacteriano (registrados como eventos fluorescentes) em relação ao total de bactérias enumeradas com coloração SYBR Green (Conterno *et al.*, 2019).

3.6.6 Determinação do metabolismo microbiano durante a fermentação fecal *in vitro*

As amostras foram coletadas no tempo zero (logo após a homogeneização dos componentes do meio de fermentação) e após 24 e 48 horas de fermentação fecal. Os valores de pH nos sistemas de fermentação fecal foram determinados seguindo procedimento padrão (AOAC, 2019). A determinação e quantificação de açúcares, ácidos orgânicos e compostos fenólicos nos meios de cultivo fermentados pela microbiota fecal humana foi realizada com uso da técnica de CLAE conforme condições analíticas descritas anteriormente no item 3.4.2.1. Para quantificação e identificação dos metabólitos, os constituintes químicos foram

estruturalmente determinados através do método espectroscópico de Ressonância Magnética Nuclear (RMN) de ^1H e ^{13}C , conforme condições analíticas descritas anteriormente na secção 3.4.2.4.

3.6.7 Determinação da capacidade antioxidante durante a fermentação fecal *in vitro*

A capacidade antioxidante das diferentes formulações nos sistemas de fermentação fecal foi avaliada no tempo zero (logo após a homogeneização dos componentes do meio de fermentação) e após 24 e 48 horas de fermentação fecal. Foram utilizados métodos já descritos na secção 3.4.2.3.

3.7 ANÁLISES ESTATÍSTICAS

Todos os ensaios foram conduzidos em triplicata em três experimentos independentes, sendo os resultados expressos como a média $\pm$ desvio padrão dos dados obtidos. Os dados foram submetidos ao teste *t* de Student ou análise de variância (ANOVA) seguida do teste de Tukey, utilizando $p \leq 0,05$ para significância. O *software* computacional GraphPad Prism 6.0 (GraphPad Software, San Jose, CA, EUA) foi utilizado para a realização das análises estatísticas. O processamento dos espectros da análise de Ressonância Magnética Nuclear foi realizado usando o *software* MestReNova[®] (MNova) versão 5.2.3. As análises de Componentes Principais (ACP) e agrupamento hierárquico (HCA) foram realizadas utilizando o *software* Past (version 4.03). Os dados obtidos do espectro de binning foram submetidos à normalização por área e a ACP foi obtida com cross validation. A relação entre as amostras e os parâmetros testados no ensaio de fermentação fecal *in vitro* foi determinada usando análise de componentes principais (SCP). O coeficiente de correlação de Pearson (R) e o valor de *p* foram calculados para mostrar as correlações em um mapa de calor. Um valor de $p \leq 0,05$ foi considerado estatisticamente significativo. O *software* GraphPad Prism 7.0 (GraphPad Software, La Jolla, CA, EUA) e o *software* R (Versão 2.15.3, Ross Ihaka & Robert Gentleman, Universidade de Auckland, Auckland, Nova Zelândia) foram utilizados para realizar a análise estatística.

4 RESULTADOS

Os resultados desta tese estão apresentados na forma dois artigos originais apresentados nos apêndices B e C. O artigo apresentado no apêndice B: **“Exploiting tropical fruit processing coproducts as circular resources to promote the growth and keep the culturability and functionality of probiotic lactobacilli ”** teve como objetivo avaliar o potencial de utilização de coprodutos do processamento de frutas tropicais (acerola, caju e goiaba) como meio para crescimento (fermentação) e manutenção da viabilidade de cepas de *Lactobacillus* (*Lactobacillus acidophilus* LA-05 e *Lacticaseibacillus paracasei* L-10) durante a liofilização, armazenamento refrigerado e digestão gastrointestinal simulada. Os resultados mostraram que, quando utilizados como meios de cultivo, CACE, CCAS e CGUA resultaram em contagem de células viáveis de *Lactobacillus* $\geq 8,8$ log UFC/g após 24 h de fermentação. Ao longo da fermentação, houve redução na concentração dos açúcares glicose e frutose, com concomitante aumento na produção de ácidos orgânicos, e redução do pH. Após o processo de liofilização das cepas de *Lactobacillus* nos coprodutos fermentados, observaram-se altas taxas de sobrevivência, demonstrando que esses meios poderiam proteger as cepas durante a liofilização. Ao final do armazenamento, *L. acidophilus* LA-05 e *L. paracasei* L-10 liofilizados com CACE, CCAJ e CGOI apresentaram reduções menores que quando liofilizados no meio controle. CACE, CCAS e CGUA foram capazes de reduzir o tamanho de subpopulações injuriadas e mortas durante as etapas da digestão simulada. A partir desses resultados, sugere-se que CACE, CCAJ e CGOI podem atuar como meios de cultura eficientes para o crescimento de *L. acidophilus* LA-05 e *L. paracasei* L-10, com um efeito protetor sobre essas cepas durante a liofilização, armazenamento e exposição à digestão gastrointestinal simulada. Logo, o uso de coprodutos de frutas (acerola, caju e goiaba) oferece vantagens com potencial de aplicação como ingredientes bioativos circulares, apoiando um possível destino de valor agregado para esses materiais que são produzidos e descartados pela indústria de processamento de frutas, contribuindo para diminuir os impactos ambientais negativos.

O artigo apresentado no apêndice C, intitulado: **“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”** avaliou os efeitos de coprodutos do processamento de acerola e goiaba fermentados com os probióticos *Lactobacillus acidophilus* LA-05 e *Lacticaseibacillus paracasei* L-10 na abundância de diferentes grupos bacterianos intestinais e na atividade metabólica microbiana durante 48 horas de fermentação fecal com inóculo fecal humano reunido. Os coprodutos de frutas fermentados

e digeridos aumentaram a abundância relativa de grupos bacterianos benéficos, enquanto em geral diminuíram ou mantiveram a abundância relativa de grupos bacterianos não benéficos, indicando efeitos estimuladores supostamente seletivos nas populações intestinais bacterianas benéficas. Os coprodutos estimularam a atividade metabólica microbiana ligada à diminuição do pH, consumo de açúcar, produção de ácidos graxos de cadeia curta, compostos fenólicos e alteração do perfil metabólico, apresentando alta capacidade antioxidante durante a fermentação fecal. Os resultados indicam que coprodutos fermentados de frutas podem induzir mudanças benéficas na abundância relativa de vários grupos bacterianos, bem como na atividade metabólica da microbiota intestinal humana, sendo candidatos novos e circulares para uso como ingredientes simbióticos.

REFERÊNCIAS

- ABREU, F. P. *et al.* Cashew apple (*Anacardium occidentale* L.) extract from by-product of juice processing: A focus on carotenoids. **Food Chemistry**, v. 138, n. 1, p. 25-31, 2013.
- ALBUQUERQUE, M. A. C. *et al.* Tropical fruit by-products water extracts as sources of soluble fibres and phenolic compounds with potential antioxidant, anti-inflammatory, and functional properties. **Journal of Functional Foods**, v. 52, p. 724-733, 2019.
- 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, n. 4, p. 704–716, 2017.
- ALBUQUERQUE, M. A. C. *et al.* Supplementation with fruit and okara soybean by-products and amaranth flour increases the folate production by starter and probiotic cultures. **International Journal of Food Microbiology**, v. 236, p. 26-32, 2016.
- ALBUQUERQUE, M. A. C. *et al.* Supplementation with fruit and okara soybean by-products and amaranth flour increases the folate production by starter and probiotic cultures. **International Journal of Food Microbiology**, v. 236, p. 26-32, 2016.
- ALBUQUERQUE, T. L. *et al.* Xylitol production from cashew apple bagasse by *Kluyveromyces marxianus* CCA510. **Catalysis Today**, v. 255, p.33-40, 2015.
- ALBUQUERQUE, T. M. R. *et al.* Effects of digested flours from four different sweet potato (*Ipomoea batatas* L.) root varieties on the composition and metabolic activity of human colonic microbiota *in vitro*. **Journal of Food Science**, v. 86, n. 8, p. 3707-3719, 2021.
- ALMEIDA, M. M. B. *et al.* Bioactive compounds and antioxidant activity of fresh exotic fruits from northeastern Brazil. **Food Research International**, v. 44, n. 7, p. 2155-2159, 2011.
- ANDRADE, R.A.M.S; MACIEL, M.I.S; SANTOS, A.M.P; MELO, E.A. Optimization of the extraction process of polyphenols from cashew apple agro-industrial residues. **Food Science and Technology**, v.35, p. 354-360, 2015.
- AOAC. **Official methods of analysis of AOAC international**. 21th. ed. Gaithersburg, Md.: AOAC International, 2019.
- APARICIO-GARCÍA, N. *et al.* Changes in protein profile, bioactive potential and enzymatic activities of gluten-free flours obtained from hulled and dehulled oat varieties as affected by germination conditions. **LWT - Food Science and Technology**, v. 132, Article 109955, 2020.
- ARAÚJO, K. L. *et al.* Antioxidant activity of co-products from guava, mango and barbados cherry produced in the Brazilian Northeast. **Molecules**, v. 19, n. 3, p. 3110-3119, 2014.
- 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. 1, p. 96, 2020.

AVONTS, L. *et al.* Cell growth and bacteriocin production of probiotic *Lactobacillus* strains in different media. **International Dairy Journal**, v. 14, p. 947–955, 2004.

BAGAD, M. *et al.* Survivability of freeze-dried probiotic *Pediococcus pentosaceus* strains GS4, GS17 and *Lactobacillus gasseri* (ATCC 19992) during storage with commonly used pharmaceutical excipients within a period of 120 days. **Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine**, v. 7, n.10, p. 921-929, 2017.

BANGAR, S. P. *et al.* Organic acids production from lactic acid bacteria: a preservation approach. **Food Bioscience**, v. 46, p. 101615, 2022.

BARAJAS-ÁLVAREZ, P.; GONZÁLEZ-ÁVILA, M.; ESPINOSA-ANDREWS, A. Microencapsulation of *Lactobacillus rhamnosus* HN001 by spray drying and its evaluation under gastrointestinal and storage conditions. **LWT – Food Science and Technology**, v. 153, p. 112485, 2022.

BARRETO, G. P. DE M. *et al.* Compostos bioativos em sub-produtos da castanha de caju. **Alimentos e Nutrição**, v. 18, n. 2, p. 207-213, 2007.

BARROS, R. G. C. *et al.* Evaluation of bioactive compounds potential and antioxidant activity in some Brazilian exotic fruit residues. **Food Research International**, v. 102, p. 84-92, 2017.

BARROS, B. R. S. *et al.* Phytochemical analysis, nutritional profile and immunostimulatory activity of aqueous extract from *Malpighia emarginata* DC leaves. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 23, p. 101442, 2020.

BATAGLION, G. A. *et al.* Determination of the phenolic composition from Brazilian tropical fruits by UHPLC–MS/MS. **Food Chemistry**, v. 180, p. 280-287, 2015.

BATISTA, K. S. *et al.* Beneficial effects of consumption of acerola, cashew or guava processing by-products on intestinal health and lipid metabolism in dyslipidaemic female Wistar rats. **British Journal of Nutrition**, v. 119, p. 30-41, 2018.

BELWAL, T. *et al.* Phytopharmacology of acerola (*Malpighia* spp.) and its potential as functional food. **Trends in Food Science & Technology**, v. 74, p. 99-106, 2018.

BENZIE, I. F. F.; STRAIN, J. J. Ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of antioxidant power: The FRAP assay. **Analytical Biochemistry**, v. 239, p. 70-76, 1996.

BORGES, S. *et al.* A feasibility study of *Lactobacillus plantarum* in fruit powders after processing and storage. **International Journal of Food Science and Technology**, v. 51, p. 381–388, 2016.

BORTOLOTTI, C.T. *et al.* Hydrodynamic study of a mixture of West Indian cherry residue and soybean grains in a spouted bed. **The Canadian Journal of Chemical Engineering**, v. 91, p. 1871–1880, 2013.

BOSNEA, L. A. *et al.* Functionality of freeze-dried *L. casei* cells immobilized on wheat grains. **LWT - Food Science and Technology**, v. 42, p. 1696-1702, 2009.

BRAND-WILLIAMS, W., CUVELIER, M. E., & BERSET, C. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. **LWT - Food Science and Technology**, v. 28, n. 1, p. 25–30, 1995.

BRASIL. AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA – ANVISA. Alimentos Com Alegações de Propriedades Funcionais e ou de Saúde. Brasília: ANVISA. Disponível em: <http://portal.anvisa.gov.br/alimentos/alegacoes>. Acesso em: agost. 2023.

BROECKX, G. *et al.* Drying techniques of probiotic bacteria as an important step towards the development of novel pharmabiotics. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 505, p. 303–318, 2016.

BURNS, P. *et al.* Suitability of whey and buttermilk for the growth and frozen storage of probiotic *lactobacilli*. **International Journal Dairy Technology**, v. 61, p. 156–164, 2008.

BUSSOLO DE SOUZA, C. *et al.* Degradation of fibres from fruit by-products allows selective modulation of the gut bacteria in an *in vitro* model of the proximal colon. **Journal of Functional Foods**, v. 57, p. 275–285, 2019.

CÁDIZ-GURREA, M. de la 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, p. 109786, 2020.

CAETANO, P. K.; DAIUTO, É. R.; VIEITES, R. L. Característica físico-química e sensorial de geleia elaborada com polpa e suco de acerola. **Brazilian Journal of Food Technology**, v. 15, n. 3, p. 191-197, 2012.

CAMPOS, D.A. *et al.* Management of fruit industrial by-products — A case study on circular economy approach. **Molecules**, v. 25, p.320, 2020.

CAN-CAUICH, C. A. *et al.* Tropical fruit peel powders as functional ingredients: Evaluation of their bioactive compounds and antioxidante activity. **Journal of Functional Foods**, v. 37, p. 501–506, 2017.

CARR, M. K. V. The water relations and irrigation requirements of cashew (*Anacardium occidentale* L.): a review. **Experimental Agriculture**, v. 50, n. 1, p. 24–39, 2014.

CARVALHO, A. S. *et al.* Effects of various sugars added to growth and drying media upon thermotolerance and survival throughout storage of freeze-dried *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus*. **Biotechnology Progress**, v. 20, p. 248-254, 2004.

CASAROTTI, S. N. *et al.* Guava, orange and passion fruit by-products: Characterization and its impacts on kinetics of acidification and properties of probiotic fermented products. **LWT - Food Science and Technology**, v. 98, p. 69-76, 2018.

CASSANI, L.; GOMEZ-ZAVAGLIA, A.; SIMAL-GANDARA, J. Technological strategies ensuring the safe arrival of beneficial microorganisms to the gut: From food processing and

storage to their passage through the gastrointestinal tract. **Food Research International**, v. 129, p.108852, 2020.

CEJAS, L. *et al.* Malt sprout, an underused beer by-product with promising potential for the growth and dehydration of lactobacilli strains. **Journal of Food Science and Technology**, v. 54, n. 13, p.4464–4472, 2017.

CHANG, L. S. *et al.* Storage stability, color kinetics and morphology of spray-dried soursop (*Annona muricata* L.) powder: Effect of anticaking agents. **International Journal of Food Properties**, v. 21, n. 1, p. 1937–1954, 2018.

CHEN, H. *et al.* Response surface optimization of lyoprotectant for *Lactobacillus bulgaricus* during vacuum freeze-drying. **Preparative Biochemistry and Biotechnology**, v. 45, p. 463-475, 2015.

CHENG, Z. *et al.* Effects of freeze drying in complex lyoprotectants on the survival, and membrane fatty acid composition of *Lactobacillus plantarum* L1 and *Lactobacillus fermentum* L2. **Cryobiology**, v. 105, p. 1-9, 2022.

CHOTIKO, A.; SATHIVEL, S. Effects of enzymatically-extracted purple rice bran fiber as a protectant of *L. plantarum* NRRL B-4496 during freezing, freeze drying, and storage. **LWT - Food Science and Technology**, v. 59, p. 59-64, 2014.

COELHO, E.M. *et al.* Simultaneous analysis of sugars and organic acids in wine and grape juices by HPLC: Method validation and characterization of products from northeast Brazil. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 66, p. 160-167, 2018.

COMAN, V.; VODNAR, D. C. Gut microbiota and old age: modulating factors and interventions for healthy longevity. **Experimental Gerontology**, v. 141, p. 1-18, 2020.

COMUNIAN, T. A. *et al.* The use of food by-products as a novel for functional foods: Their use as ingredients and for the encapsulation process. **Trends in Food Science & Technology**, v. 108, p. 269-280, 2021.

CONTERNO, L. *et al.* Measuring the impact of olive pomace enriched biscuits on the gut microbiota and its metabolic activity in mildly hypercholesterolaemic subjects. **European Journal of Nutrition**, v. 58, p. 63–81, 2019.

CRUZ, R. G. *et al.* Comparison of the antioxidant property of acerola extracts with synthetic antioxidants using an in vivo method with yeasts. **Food Chemistry**, v. 277, p. 698-705, 2019.

CUI, S. *et al.* Effect of acids produced from carbohydrate metabolism in cryoprotectants on the viability of freeze-dried *Lactobacillus* and prediction of optimal initial cell concentration. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 125, n. 5, p. 513-518, 2018.

DABA, G. M. e ELKHATEEB, W. A. Bacteriocins of lactic acid bacteria as biotechnological tools in food and pharmaceuticals: current applications and future prospects. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 28, p. 1– 10, 2020.

- DANTAS, A. M. *et al.* Gastrointestinal digestion assays for evaluating the bioaccessibility of phenolic compounds in fruits and their derivatives: an overview. **Food research international**, v. 170, p. 112920, 2023.
- DAVANI-DAVARI, D. *et al.* Prebiotics: definition, types, sources, mechanisms, and clinical applications. **Foods**, v. 8, n. 3, p. 92, 2019.
- DEL'ARCO, A.P.W.T; SYLOS, C. M. Effect of industrial processing for obtaining guava paste on the antioxidant compounds of guava (*Psidium guajava* L.) 'Paluma' cv. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 40, p. 1-11, 2018.
- DENG, G. F. *et al.* Potential of fruit wastes as natural resources of bioactive compounds. **International Journal of Molecular Sciences**. v. 13 n. 7, p. 8308-8323, 2012.
- DE SOUZA PEDROSA, G. T. *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, p. 108837, 2020.
- DIANAWATI, D.; MISHRA, V.; SHAH, N. P. Stability of microencapsulated *Lactobacillus acidophilus* and *Lactococcus lactis* sp. *cremoris* during storage at room temperature at low aw. **Food Research International**, v. 50, p. 259-265, 2013.
- DINKÇI, N.; AKDENİZ, V.; AKALIN, A. S. Survival of probiotics in functional foods during shelf life. **Food quality and shelf life**, p. 201–233, 2019.
- DIMITRELLOU, D. *et al.* Effect of cooling rate, freeze-drying, and storage on survival of free and immobilized *Lactobacillus casei* ATCC 393. **LWT- Food Science and Technology**, v. 69, p. 468-473, 2016.
- DOWARAH, R. *et al.* Selection and characterization of probiotic lactic acid bacteria and its impact on growth, nutrient digestibility, health and antioxidant status in weaned piglets. **PloS one**, v. 13, 2018.
- DUARTE, F. N. D. *et al.* Potential prebiotic properties of cashew apple (*Anacardium occidentale* L.) agro-industrial byproduct on *Lactobacillus* species. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 97, p. 3712-3719, 2017.
- DUTRA, M. C. P. *et al.* Integrated analyses of phenolic compounds and minerals of Brazilian organic and conventional grape juices and wines: Validation of a method for determination of Cu, Fe and Mn. **Food Chemistry**, v. 269, p. 157-165, 2018.
- DUZZIONI, A. G. *et al.* Effect of drying kinetics on main bioactive compounds and antioxidant activity of acerola (*Malpighia emarginata* D.C.) residue. **International Journal of Food Science & Technology**, v. 48, p. 1041-1047, 2013.
- ELLONG, E. N. *et al.* Polyphenols, carotenoids, vitamin C content in tropical fruits and vegetables and impact of processing methods. **Food and Nutrition Sciences**, v. 6, p. 299–313, 2015.

EUROPEAN FOOD SAFETY AUTHORITY – EFSA. Scientific Opinion. Guidance on the assessment of bacterial susceptibility to antimicrobials of human and veterinary importance. **EFSA Journal**, v. 10, p. 2740, 2012.

FAO WHO. Guidelines for the evaluation of probiotics in food. London, Ontario: Food and Agriculture Organization of the United Nations and World Health Organization Working Group Report, 1-11, 2002.

FERREIRA, T. S. *et al.* Resíduo de acerola em dietas para codornas. **Arquivos Brasileiros de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 71, p. 259-266, 2019.

FINAMORE, A. *et al.* Supplementation with *Bifidobacterium longum* Bar33 and *Lactobacillus helveticus* Bar13 mixture improves immunity in elderly and old mice. **Nutrition**, v. 63-64, p. 184-192, 2019.

FREITAS, S. C. *et al.* Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Procedimento operacional padrão para determinação de fibras solúvel e insolúvel**. Rio de Janeiro: EMBRAPA, 2008.

FOLCH, J.; LEES, M.; STANLEY, G. H. S. A simple method for the isolation and purification of total lipides from animal tissues. **Journal of Biological Chemistry**, v. 226, n.1, p. 497-509, 1957.

FONSECA, F. *et al.* Factors influencing the membrane fluidity and the impact on production of lactic acid bacteria starters. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 103, p.6867-6883, 2019.

FONSECA, F. *et al.* Freeze-drying of lactic acid bacteria. **Methods in Molecular Biology**, v. 1257, p.477-88, 2015.

FONTELES, T.V. *et al.* Sonication effect on bioactive compounds of cashew apple bagasse. **Food and Bioprocess Technology**, v. 10, p. 1854–1864, 2017.

FURLANETO, F. de P.; NASSER, M. D. PANORAMA DA CULTURA DA ACEROLA NO ESTADO DE SÃO PAULO. **Pesquisa & Tecnologia**, v. 12, n. 1, p. 1-6, 2015.

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 Microbiology**, v. 49, p. 197–202, 2015.

GARCIA, E. F. *et al.* The performance of five fruit-derived and freeze-dried potentially probiotic *Lactobacillus* strains in apple, orange, and grape juices. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 98, n. 13, p. 5000–5010, 2018.

GARRUTI, D. S. *et al.* Evaluation of volatile flavour compounds from cashew apple (*Anacardium occidentale* L.) juice by the Osme gas chromatography/olfactometry technique. **Journal of the Science Food and Agriculture**, v. 83, n. 14, p. 1455-1462, 2003.

GAYATHRI, D.; RASHMI, B. S. Mechanism of development of depression and probiotics as adjuvant therapy for its prevention and management. **Mental Health &**

Prevention, v. 5, n. 1, p. 40–51, 2017.

GEBARA, C. *et al.* Effectiveness of different methodologies for the selective enumeration of *Lactobacillus acidophilus* La5 from yoghurt and Prato cheese. **LWT - Food Science and Technology**, v. 64, n. 1, p. 508-513, 2015.

GENEVOIS, C. *et al.* Byproduct from pumpkin (*Cucurbita moschata* Duchesne ex poiret) as a substrate and vegetable matrix to contain *Lactobacillus casei*. **Journal of Functional Foods**, v. 23, p. 210-219, 2016.

GIBSON, G. R. *et al.* Expert consensus document: the International Scientific Association for Probiotics and Prebiotics (ISAPP) consensus statement on the definition and scope of prebiotics. **Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology**, v. 14, n. 8, p. 491-502, 2017.

GIBSON, G. R. *et al.* Dietary prebiotics: Current status and new definition. **Food Science and Technology Bulletin of Functional Foods**, v. 7, n. 1, p. 1–19, 2010.

GIL-SANCHEZ, I. *et al.* Chemical characterization and *in vitro* colonic fermentation of grape pomace extracts. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 97, n. 10, p. 3433–3444, 2017.

GOLOWCZYK, M. *et al.* Use of whey permeate containing *insitu* synthesized galacto-oligosaccharides for the growth and preservation of *Lactobacillus plantarum*. **Journal of Dairy Research** v. 80, n. 3, p. 374–381, 2013.

GOMES, A. M. P. *et al.* Growth enhancement of *Bifidobacterium lactis* Bo and *Lactobacillus acidophilus* Ki by milk hydrolyzates. **Journal Dairy Science**, v. 81, p. 2817–2825, 1998.

GONÇALVES, S. *et al.* Effect of *in vitro* gastrointestinal digestion on the total phenolic contents and antioxidant activity of wild Mediterranean edible plant extracts. **European Food Research and Technology**, v. 245, p. 753-762, 2019.

GONZALEZ-AGUIAR, G. A. *et al.* Bioactive compounds in fruits: health benefits and effect of storage conditions. **Postharvest Stewart Review**, v. 4, n. 3, p. 1-10, 2008.

GUERGOLETTI, K. B. *et al.* Survival of *Lactobacillus casei* (LC-1) adhered to prebiotic vegetal fibers. **Innovative Food Science & Emerging Technologies**, v.11, p. 415-421, 2009.

GUERGOLETTI, K.B. *et al.* *In vitro* fermentation of juçara pulp (*Euterpe edulis*) by human colonic microbiota. **Food Chemistry**, v.196, p.251-258, 2016.

GUO, X. *et al.* Gut microbiota is a potential biomarker in inflammatory bowel disease. **Frontiers in Nutrition**, v. 8, p. 1340, 2022.

HEALTH CANADA. Accepted Claims about the Nature of Probiotic Microorganisms in Food. Health Canada. 2009. Disponível em: [http://www.hc-sc.gc.ca/fn-an/labelle/etiquet/claims-reclam/probiotics_claims-allegations_probiotiques-eng.php%20\(2009\)](http://www.hc-sc.gc.ca/fn-an/labelle/etiquet/claims-reclam/probiotics_claims-allegations_probiotiques-eng.php%20(2009)). Acesso em: jul. 2023.

HEENAN, C. N. *et al.* Growth medium for culturing probiotic bacteria for applications in vegetarian food products. **LWT- Food Science Technology**, v. 35, p. 171–176, 2002.

HEIDEBACH, T. I. *et al.* Influence of casein-based microencapsulation on freeze-drying and storage of probiotic cells. **Journal of Food Engineering**, v. 98, p. 309-316, 2010.

HERIGSTAD, B.; HAMILTON, M.; HEERSINK, J. How to optimize the drop plate method for enumerating bacteria. **Journal of Microbiological Methods**, v. 44, n. 2, p. 121–129, 2001.

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, p. 506-514, 2014.

HIRASAWA, M.; KURITA-OCHIAI, T. Probiotic potential of lactobacilli isolated from saliva of periodontally healthy individuals. **Oral Health & Preventive Dentistry**, v. 18, p. 563– 570, 2020.

HOU, Q. *et al.* Probiotic-directed modulation of gut microbiota is basal microbiome dependent. **Gut Microbes**, v. 12, n. 1, p. 1736974, 2020.

HUANG, S. *et al.* Spray drying of probiotics and other food-grade bacteria: A review. **Trends in Food Science & Technology**, v. 63, p. 1–17, 2017.

HUBALEK, Z. Protectants used in the cryopreservation of microorganisms. **Cryobiology**, v. 46, p. 205–229, 2003.

INFANTE, J. *et al.* Antioxidant activity of agroindustrial residues from tropical fruits. **Brazilian Journal of Food Nutrition**, v. 24, n. 1, p. 87-91, 2013.

JOSHI, D. *et al.* Prebiotics: A functional food in health and disease. In: **Natural products and drug discovery**. Elsevier, p. 507-523, 2018.

KONG, K. *et al.* Lycopene-rich fractions derived from pink guava by-product and their potential activity towards hydrogen peroxide-induced cellular and DNA damage. **Food Chemistry**, v. 123, p. 1142-1148, 2010.

KUMAR, S. *et al.* Trends in non-dairy-based probiotic food products: Advances and challenges. **Journal of Food Processing and Preservation**, v. 46, p. 16578, 2022

KURTMANN, L. *et al.* Storage stability of freeze-dried *Lactobacillus acidophilus* (La-5) in relation to water activity and presence of oxygen and ascorbate. **Cryobiology**, v. 58, n. 2, p. 175–180, 2009.

LARSEN, O.; CLAASSEN, E. The mechanistic link between health and gut microbiota diversity. **Scientific Reports**, v. 8, n. 1, p. 1-5, 2018.

LEMMENS, L. *et al.* Towards a better understanding of the relationship between the β -carotene in vitro bio-accessibility and pectin structural changes: A case study on carrots. **Food Research International**, v. 42, n. 9, p. 1323-1330, 2009.

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

LI, C.; NIE, S. P.; DING, Q.; ZHU, K. X.; WANG, Z. J.; XIONG, T.; XIE, M. Y. Cholesterol-lowering effect of *Lactobacillus plantarum* NCU116 in a hyperlipidaemic rat model. **Journal of Functional Foods**, v. 8, p. 340–347, 2014.

LIM, S.Y.; THAM, P.Y.; LIM, H.Y.L.; HENG, W.S.; CHANG, Y.P. Potential Functional Byproducts from Guava Pure Processing. **Journal of Food Science**, v. 83, n. 6, p. 1521-1532, 2018.

LIMA, R.S.; FERREIRA, S.R.S.; VITALI, L.; BLOCK, J.M. May the superfruit red guava and its processing waste be a potential ingredient in functional foods? **Food Research International**, v. 115, p. 451-459, 2019.

LING, C. X.; CHANG, Y. P. Valorizing guava (*Psidium guajava* L.) seeds through germination-induced carbohydrate changes. **Journal of Food Science and Technology**, v. 54, n. 7, p. 2041–2049, 2017.

LOPES, L. G. *et al.* The intake of dry cashew apple fiber reduced fecal egg counts in *Haemonchus contortus*-infected sheep. **Experimental Parasitology**, v. 195, p. 38–43, 2018.

LOZUPONE, C. A. *et al.* Diversity, stability and resilience of the human gut microbiota. **Nature**, v. 489, n. 7415, p. 220-230, 2012.

LU, Y.; HUANG, L.; YANG, T.; LV, F.; LU, Z. Optimization of a cryoprotective medium to increase the viability of freeze-dried *Streptococcus thermophilus* by response surface methodology. **LWT - Food Science and Technology**, v. 80, p. 92-97, 2017.

MAJERSKA, J. *et al.* A review of new directions in managing fruit and vegetable processing by-products. **Trends Food Science Technology**, v. 88, p. 207–219.

MARTÍN, M. J. *et al.* Microencapsulation of bacteria: A review of different technologies and their impact on the probiotic effects. **Innovative Food Science & Emerging Technologies**, v. 27, p. 15-25, 2015.

MARTINS, E. *et al.* Short communication: Effect of lactose on the spray drying of *Lactococcus lactis* in dairy matrices. **Journal Dairy Science**, v. 102, n. 11, p. 9763-9766, 2019.

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

MATTO, J.; ALAKOMI, H.L.; VAARI, A.; VIRKAJARVI, K.; SAARELA, M. Influence of processing conditions on *Bifidobacterium animalis* subsp *lactis* functionality with a special focus on acid tolerance and factors affecting it. **International Dairy Journal**, v. 16, p. 1029–1037, 2006.

- MEDINA, N. N. R.; HERRERO, J. V. I. Guava (*Psidium guajava* L.) cultivars: An important source of nutrients for human health. In **Nutritional Composition of Fruit Cultivars**, p. 287–315, 2016.
- MENG, X. C.; STANTON, C.; FITZGERALD, G. F.; DALY, C.; ROSS, R. P. Anhydrobiotics: The challenges of drying probiotic cultures. **Food Chemistry**, v. 106, p. 1406-1416, 2008.
- MENG, D. *et al.* Indole-3-lacticacid, a metabolite of tryptophan, secreted by *Bifidobacterium longum* subspecies *infantis* is anti-inflammatory in the immature intestine. **Pediatric Research**, v. 88, p. 209– 217, 2020.
- MENG, T. *et al.* Anti-inflammatory action and mechanisms of resveratrol. **Molecules**, v. 26, n. 1, p. 229, 2021.
- MEKKI, A.; AROUS, F; ALOUI, F; SAYADI, S. Treatment and valorization of agrowastes as biofertilizers. **Waste Biomass Valorization**, v. 8, p. 611–619, 2017.
- MENEZES, F. N. D. D. *et al.* Acerola (*Malpighia glabra* L.) and guava (*Psidium guayaba* L.) industrial processing by-products stimulate probiotic *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* growth and induce beneficial changes in colonic microbiota. **Journal of Applied Microbiology**, v. 130, n. 4, p. 1323-1336, 2021a.
- MENEZES, F. N. D. D. *et al.* Impact of cashew (*Anacardium occidentale* L.) by-product on composition and metabolic activity of human colonic microbiota in vitro indicates prebiotic properties. **Current Microbiology**, v. 78, n. 6, p. 2264-2274, 2021b.
- MIRI, S. T. *et al.* The impact of *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* probiotic cocktail on modulation of gene expression of gap junctions dysregulated by intestinal pathogens. **Archives of Microbiology**, v. 204, n. 7, p. 417, 2022.
- MONTEIRO, S. A.; BARBOSA, M. M.; SILVA, F. F. M.; BEZERRA, F.; MAIA, K. S. Preparation, phytochemical and bromatological evaluation of flour obtained from the acerola (*Malpighia puniceifolia*) agroindustrial residue with potential use as fiber source. **LWT - Food Science and Technology**, v. 134, p. 110142, 2020.
- MULLER, J.; ROSS, R.; FITZGERALD, G.; STANTON, C. Manufacture of probiotic bacteria. **Prebiotics and Probiotics Science and Technology**, p. 725–759, 2009.
- NARVÁEZ-CUENCA, C. E. *et al.* The phenolic compounds, tocopherols, and phytosterols in the edible oil of guava (*Psidium guava*) seeds obtained by supercritical CO₂ extraction. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 89, p. 103467, 2020.
- 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**, p. 1-13, 2022.
- NIKBAKHT, E. *et al.* Effect of probiotics and synbiotics on blood glucose: a systematic review and meta-analysis of controlled trials. **European Journal of Nutrition**, v. 57, n. 1, p. 95–106, 2018.

- NOGUEIRA, R. J. M. C. *et al.* Efeito do estágio de maturação dos frutos nas características físico-químicas de acerola. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 37, n. 4, p. 463-470, 2002.
- NUNES, G. L., *et al.* Inulin, hi-maize, and trehalose as thermal protectants for increasing viability of *Lactobacillus acidophilus* encapsulated by spray drying. **LWT- Food Science and Technology**, v. 89, p.128–133, 2018.
- OLIVEIRA, S. D. *et al.* Improvement in physicochemical characteristics, bioactive compounds and antioxidant activity of acerola (*Malpighia emarginata* DC) and guava (*Psidium guajava* L.) fruit by-products fermented with potentially probiotic lactobacilli. **LWT - Food Science and Technology**, p. 110200, 2020.
- ORREGO, C. E. *et al.* Developments and trends in fruit bar production and characterization. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 54, p. 84–97, 2014.
- OWOLABI, I. O. *et al.* Gut microbiota metabolism of functional carbohydrates and phenolic compounds from soaked and germinated purple rice. **Journal of Functional Foods**, v. 66, p. 1-13, 103787, 2020.
- PADILHA, C.V.S. *et al.* Rapid determination of flavonoids and phenolic acids in grape juices and wines by RP-HPLC/DAD: Method validation and characterization of commercial products of the new Brazilian varieties of grape. **Food Chemistry**, v. 228, p. 106-115, 2017.
- PALANIVELU, J. *et al.* Probiotics in functional foods: survival assessment and approaches for improved viability. **Applied Sciences**, v. 12, n. 1, p. 455, 2022.
- PALFRAMAN, R. *et al.* Development of a quantitative tool for the comparison of the prebiotic effect of dietary oligosaccharides. **Letters in Applied Microbiology**, v. 37, p. 281–284, 2003.
- PALMFELDT, J.; HAHN-HÆGERDAL, B. Influence of culture pH on survival of *Lactobacillus reuteri* subjected to freeze-drying. **International Journal of Food Microbiology**, v. 55, p. 235-238, 2000.
- PAPARELLA, A. *et al.* Flow cytometric assessment of the antimicrobial activity of essential oils against *Listeria monocytogenes*. **Food Control**, v. 19, p. 1174–1182, 2008.
- PAULA, D. G. C. *et al.* Maceration time over antioxidant activity, volatile compounds and temporal dominant sensation of fermented jabuticaba. **Food Science and Technology**, v. 42, e43221, 2022.
- PAZ, M. *et al.* Brazilian fruit pulps as functional foods and additives: Evaluation of bioactive compounds. **Food Chemistry**, v. 172, p. 462-468, 2015.
- PEDROSA, G. T. *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, n. August, p. 108837, 2020.

- PEIXOTO, H. *et al.* Anthocyanin-rich extract of açai (*Euterpe precatoria* Mart.) mediates neuroprotective activities in *Caenorhabditis elegans*. **Journal of Functional Foods**, v. 26, p. 385–393, 2016.
- PEREDO-LOVILLO, A.; ROMERO-LUNA, H. E.; JIMÉNEZ-FERNÁNDEZ, M. Health promoting microbial metabolites produced by gut microbiota after prebiotics metabolism. **Food Research International**, v. 136, p. 109473, 2020.
- Pereira, A. L. F., & Rodrigues, S. Chapter 15 - Turning fruit juice into probiotic beverages. **Fruit juices**, p. 279–287, 2018.
- PINHO, L. X. *et al.* The use of cashew apple residue as source of fiber in low fat hamburgers. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 31, n. 4, p. 941-945, 2011.
- PRAKASH, A.; BASKARAN, A. Acerola, an untapped functional superfruit: a review on latest frontiers. **Journal Food Science Technology**, v. 55, n. 9, p. 3373-3384, 2018.
- PRAKASH, A. *et al.* Evaluation of antioxidant and antimicrobial properties of solvent extracts of agro-food by-products (cashew nut shell, coconut shell and groundnut hull). **Agriculture and Natural Resources**, v. 52, p. 451-459, 2018.
- PROSKY, L. *et al.* Determination of insoluble and soluble dietary fibers in foods and food products. **Journal of AOAC International**, v. 2, p. 360–367, 1992.
- QUEIROZ, C. *et al.* Changes in bioactive compounds and antioxidant capacity of fresh-cut cashew apple. **Food Research International**, v. 44, n. 5, p.1459-1462, 2011.
- QUIGLEY, E.E.M. Microbiome-directed therapies: past, present, and future - Prebiotics and Probiotics in Digestive Health. **Clinical Gastroenterology and Hepatology**, v. 17, p. 33-344, 2019.
- QUINTANA, G. *et al.* Okara: A nutritionally valuable by-product able to stabilize *Lactobacillus plantarum* during freeze-drying, spray-drying and storage. **Frontiers in Microbiology**, v. 8, p. 641, 2017.
- RAMADAN, L. *et al.* A New Hybrid System for Reuse of Agro-industrial Wastes of Acerola: Dehydration and Fluid Dynamic Analysis. **Waste and Biomass Valorization**, p. 1- 11, 2018.
- RAZAVI, S. *et al.* Microencapsulating polymers for probiotics delivery systems: preparation, characterization, and applications. **Food Hydrocolloids**, p. 106882, 2021.
- REALINI, C. E.; GUÁRDIA, M.D.; DÍAZ, I.; GARCÍA-REGUEIRO, J.A.; ARNAU, J. Effects of acerola fruit extract on sensory and shelf-life of salted beef patties from grinds differing in fatty acid composition. **Meat Science**, v. 99, p. 18–24, 2015.
- REQUENA, T. *et al.* Perspectives of the potential implications of wine polyphenols on human oral and gut microbiota. **Trends in Food Science Technology**, v. 21, p. 332, 2010.

REYES, V. *et al.* Viability of *Lactobacillus acidophilus* NRRL B-4495 encapsulated with high maize starch, maltodextrin, and gum Arabic. **LWT- Food Science and Technology**, v. 96, p. 642–647, 2018.

RIBEIRO, B. S., & De Freitas, S. T. Maturity stage at harvest and storage temperature to maintain postharvest quality of acerola fruit. **Scientia Horticulturae**, v. 260, p. 108901, 2020.

ROCCHETTI, G. *et al.* Edible nuts deliver polyphenols and their transformation products to the large intestine: An *in vitro* fermentation model combining targeted/untargeted metabolomics. **Food Research International**, v. 116, p. 786-794, 2019.

ROCKENBACH, I. I. *et al.* Phenolic compounds content and antioxidant activity in pomace from selected red grapes (*vitis vinifera* L. and *vitis labrusca* L.) widely produced in Brazil. **Food Chemistry**, v. 127, p. 174-179, 2011.

RODRIGUES, D. *et al.* *In vitro* fermentation and prebiotic potential of selected extracts from seaweeds and mushrooms. **LWT - Food Science and Technology**, v.73, p. 131-139, 2016.

RODRÍGUEZ, O. *et al.* Effect of indirect cold plasma treatment on cashew apple juice (*Anacardium occidentale* L.). **LWT - Food Science and Technology**, v. 84, p. 457–463, 2017.

ROMANO, N. *et al.* Prebiotics as protectants of lactic acid bacteria. **Bioactive foods in promoting health: Probiotics, prebiotics, and synbiotics**. p. 155–164, 2015.

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, p. 251–258, 2016.

ROMERO-LUNA, H. E. *et al.* Bioactive peptides produced by engineered probiotics and other food-grade bacteria: A review. **Food Chemistry**, v. 13, p. 100196, 2022.

SAAD, N. A; DELATTRE B, M; URDACI C, J.M; SCHMITTER D, P. An overview of the last advances in probiotic and prebiotic field. **LWT - Food Science and Technology**, v. 50, n. 1, p. 1 – 16, 2012.

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

SABINO, L. B. S. *et al.* Polysaccharides from acerola, cashew apple, pineapple, mango and passion fruit by-products: Structure, cytotoxicity and gastroprotective effects. **Bioactive Carbohydrates and Dietary Fibre**, v. 24, Article 100228, 2020.

SADRZADEH-YEGANEH, H. *et al.* The effects of probiotic and conventional yoghurt on lipid profile in women. **British Journal of Nutrition**, v. 103, n. 12, p. 1778-1783, 2010.

SAGAR, N. A. *et al.* Fruit and Vegetable Waste: Bioactive Compounds, Their Extraction, and Possible Utilization. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, v. 17, n. 3, p. 512-531, 2018.

SAHU, S. K. *et al.* Nitric oxide application for postharvest quality retention of guava fruits. **Acta Physiologiae Plantarum**, v. 42, n. 10, p. 156, 2020.

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, p. 128264, 2021.

SAMPAIO, K. B. *et al.* 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 Research International**, v. 161, p. 111800, 2022.

SANCHO, S. O. *et al.* Characterization of the Industrial Residues of Seven Fruits and Prospection of Their Potential Application as Food Supplements. **Journal of Chemistry**, v. 2015, 2015.

SANDERS, M. E., *et al.* Probiotics and prebiotics in intestinal health and disease: from biology to the clinic. **Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology**, v. 16, p. 605–616, 2019.

SANTOS, A. S. *et al.* Effects of Quercetin and Resveratrol on *in vitro* Properties Related to the Functionality of Potentially Probiotic *Lactobacillus* Strains. **Frontiers in microbiology**, v. 10, p. 2229, 2019.

SANTOS, M.I. *et al.* Galacto-oligosaccharides and lactulose as protectants against desiccation of *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*. **Biotechnology Progress**, v. 30, p.1231–1238, 2014.

SANTOS, M. I. *et al.* Stability of freeze-dried *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* in the presence of galacto-oligosaccharides and lactulose as determined by near infrared spectroscopy. **Food Research International**, v. 59, p. 53-60, 2014.

SARIBURUN, E. *et al.* Phenolic content and antioxidant activity of raspberry cultivars. **Journal of Food Science**, v. 75, n. 4, p. 328-335, 2010.

SAVINI, M. *et al.* Pilot-scale production and viability analysis of freeze-dried probiotic bacteria using different protective agents. **Nutrients**, v. 2, n. 3, p. 330–339, 2010.

SAWADOGO, M. *et al.* Cleaner production in Burkina Faso: Case study of fuel briquettes made from cashew industry waste. **Journal of Cleaner Production**, v. 195, p. 1047-1056, 2018.

SAYAGO-AYERDI, S. *et al.* Tropical fruits and their co-products as bioactive compounds and their health effects: A Review. **Foods**, v. 10, p.1952, 2021.

SCHWAB, C. *et al.* Influence of oligosaccharides on the viability and membrane

properties of *Lactobacillus reuteri* TMW1.106 during freeze-drying. **Cryobiology**, v. 55, p. 108-114, 2007.

SCHWEIGGERT, R. M. *et al.* Carotenoids, carotenoid esters, and anthocyanins of yellow-, orange-, and red-peeled cashew apples (*Anacardium occidentale* L.). **Food chemistry**, v. 200, p. 274–282, 2016.

SEGAL, J. P. *et al.* The application of omics techniques to understand the role of the gut microbiota in inflammatory bowel disease. **Therapeutic Advances in Gastroenterology**, v. 12, p. 1756284818822250, 2019.

SELMA M.V. *et al.* Interaction between phenolics and gut microbiota: role in human health. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 57, p. 6485, 2009.

SHU, G. *et al.* Effect of fructo-oligosaccharide, isomalto-oligosaccharide, inulin and xylo-oligosaccharide on survival of *B. bifidum* during freeze-drying. **Advanced Materials Research**, v. 382, p. 454-457, 2012.

SILVA, N. C. *et al.* Extraction of phenolic compounds from acerola by-products using chitosan solution, encapsulation and application in extending the shelf-life of guava. **Food Chemistry**, v. 354, p. 129553, 2021.

SILVA, J. A. A. D. *et al.* Advances in the propagation of Jabuticaba tree. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 41, n. 3, p. 1-10, 2019.

SILVA, P. B. *et al.* Dehydration of acerola (*Malpighia emarginata* D.C.) residue in a new designed rotary dryer: effect of process variables on main bioactive compounds. **Food and Bioproducts Processing**, v. 98, p. 62–70, 2016.

SILVA, L. M. R. *et al.* Quantification of bioactive compounds in pulps and by-products of tropical fruits from Brazil. **Food Chemistry**, v. 143, n. 1, p. 398–404, 2014.

SINGH, R. P. *et al.* Generation of structurally diverse pectin oligosaccharides having prebiotic attributes. **Food Hydrocolloids**, v. 108, p. 105988, 2020.

STRÄUBER, H.; MÜLLER, S. Viability states of bacteria - Specific mechanisms of selected probes. **Cytometry Part A**, v. 77, n. 7, p. 623–634, 2010.

STRASSER, S.; NEUREITE, M.; GEPPL, M.; BRAUN, R.; DANNER, H. Influence of lyophilization, fluidized bed drying, addition of protectants, and storage on the viability of lactic acid bacteria. **Journal of Applied Microbiology**, v. 107, p. 167-177, 2009.

SOUSA, M. S. B.; VIEIRA, L. M. Total phenolics and in vitro antioxidant capacity of tropical fruit pulp wastes. **Brazilian Journal of Food Technology**, v. 14, n. 3, p. 202-210, 2011.

SOUZA LIMA, A. C. *et al.* Evaluation of freeze-dried phenolic extract from cashew apple by-product: Physical properties, in vitro gastric digestion and chemometric analysis of the powders. **Food Chemistry**, v. 5, p.100149, 2022.

TACO – Tabela Brasileira de Composição de Alimentos/NEPA-UNICAMP. 4 ed., revisada e ampliada, Campinas: NEPAUNICAMP, 2011, 161 p.

TALASIL, U.; SHAIK, K. B. Quality, spoilage and preservation of cashew apple juice: A review. **Journal of Food Science Technology**, v. 52, n. 1, p. 54-62, 2015.

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

TREICHEL, M.; KIST, B. B.; SANTOS, C. E. dos; CARVALHO de, C. CARVALHO de; BELING, R. R. **Anuário brasileiro da fruticultura 2016**, Santa Cruz do Sul: editora Gazeta; Santa Cruz, 88 p. 2016. Disponível em: <http://www.grupogaz.com.br/tratadas/eo_edicao/4/2016/04/20160414_0d40a2e2a/pdf/5149_2016fruticultura.pdf>. Acesso: Ago. 2023.

TRIGO, J. P. *et al.* High value-added compounds from fruit and vegetable by-products - Characterization, bioactivities, and application in the development of novel food products. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 60, n. 8, p. 1388–1416, 2020.

TYMCZYSZYN, E. E. *et al.* Galacto- oligosaccharides as protective molecules in the preservation of *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*. **Cryobiology**, n. 62, p. 123-129, 2011.

TYMCZYSZYN, E. E. *et al.* Effect of physical properties on the stability of *Lactobacillus bulgaricus* in a freeze-dried galacto-oligosaccharides matrix. **International Journal of Food Microbiology**, v. 155, n. 3, p. 217-221, 2012.

TYMCZYSZYN, E. *et al.* Effect of sugars and growth media on the dehydration of *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus*. **Journal of Applied Microbiology**, v. 102, n. 3, 845–851, 2007.

TYMCZYSZYN, E. E. *et al.* Volume recovery, surface properties and membrane integrity of *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* dehydrated in the presence of trehalose or sucrose. **Journal of Applied Microbiology**, n. 103, p. 2410–2419, 2007.

TYMCZYSZYN, E. E. *et al.* Critical water activity for the preservation of *Lactobacillus bulgaricus* by vacuum drying. **International Journal of Food Microbiology**, n. 128, p. 342–347, 2008.

UCHÔA-THOMAZ, A. M. A. *et al.* Chemical composition, fatty acid profile and bioactive compounds of guava seeds (*Psidium guajava* L.). **Food Science and Technology**, v. 34, n. 3, p. 485-492, 2014.

VANDENPLAS, Y.; HUYS, G.; DAUBE, G. Probiotics: An update. **Journal of Pediatrics**, v. 91, n. 1, p. 6-21, 2015.

VIEIRA, A. D. S. *et al.* The impact of fruit and soybean by-products and amaranth on the growth of probiotic and starter microorganisms. **Food Research International**, v. 97, p. 356-363, 2017.

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

WANG, J. J. *et al.* Modulation of gut microbiota during probiotic-mediated attenuation of metabolic syndrome in high fat diet-fed mice. **ISME Journal**, v. 9, p. 1– 15, 2015.

WANG, C. *et al.* Effects of probiotic supplementation on dyslipidemia in type 2 diabetes mellitus: a meta-analysis of randomized controlled trials. **Foods**, v. 9, p. 1540, 2020.

WANG *et al.* Polysaccharides can improve the survival of *Lactiplantibacillus plantarum* subjected to freeze-drying. **Journal of Dairy Science**, v. 104, p. 2606-2614, 2021.

YOUSSEF, M. *et al.* Fermentation of cow milk and/or pea milk mixtures by different starter cultures: Physicochemical and sensorial properties. **LWT - Food Science and Technology**, v. 69, p. 430-437, 2016.

ZANATTA, C. L.; ZOTARELLI, M. F.; CLEMENTE, E. Peroxidase (POD) e polifenoloxidase (PPO) em polpa de goiaba (*Psidium guajava* R.). **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 26, n. 3, p. 705-708, 2006.

ZHANG, X. L. *et al.* The protective effects of probiotic-fermented soymilk on high-fat diet-induced hyperlipidemia and liver injury. **Journal of Functional Foods**, v. 30, p. 220-227, 2017.

ZHAO, X. *et al.* Therapeutic and improving function of lactobacilli in the prevention and treatment of cardiovascular-related diseases: A novel perspective from gut microbiota. **Frontiers in Nutrition**, v. 8, p. 693412, 2021.

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

APÊNDICES

APÊNDICE A – TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO(TCLE)

UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
DEPARTAMENTO DE NUTRIÇÃO

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO (TCLE)

Prezado(a) **participante da pesquisa,**

A pesquisadora, Caroliny Mesquita Araújo, aluna do Programa de Pós-Graduação em Ciências da Nutrição, Universidade Federal da Paraíba, sob orientação da professora Maria Elieidy Gomes de Oliveira, docente do Departamento de Nutrição, da Universidade Federal da Paraíba, convida você a participar da pesquisa intitulada “**POTENCIAL DE COPRODUTOS DE FRUTAS TROPICAIS COMO RECURSOS CIRCULARES PARA PROMOVER A VIABILIDADE PROBIÓTICA DE *LACTOBACILLUS* EM BIOPROCESSAMENTOS E A MODULAÇÃO DA MICROBIOTA INTESTINAL**”. Para tanto você precisará assinar o TCLE que visa assegurar a proteção, a autonomia e o respeito aos participantes de pesquisa em todas as suas dimensões: física, psíquica, moral, intelectual, social, cultural e/ou espiritual – e que a estruturação, o conteúdo e forma de obtenção dele observam as diretrizes e normas regulamentadoras de pesquisas envolvendo seres humanos preconizadas pela Resolução nº 466/2012 e/ou Resolução nº 510/2016, do Conselho Nacional de Saúde e Ministério da Saúde.

Sua decisão de participar neste estudo deve ser voluntária e que ela não resultará em nenhum custo ou ônus financeiro para você (ou para o seu empregador, quando for este o caso) e que você não sofrerá nenhum tipo de prejuízo ou punição caso decida não participar desta pesquisa. Todos os dados e informações fornecidos por você serão tratados de forma anônima/sigilosa, não permitindo a sua identificação.

Esta pesquisa tem por objetivo avaliar o potencial de coprodutos de acerola, caju e goiaba como meio de cultivo de cepas de *Lactobacillus*, avaliando parâmetros de atividade metabólica durante a fermentação, bem como a estabilidade dessas cepas quando submetidas ao processo de desidratação (liofilização), armazenamento refrigerado e exposição ao trato gastrointestinal simulado. Em soma, ainda se avaliou os efeitos dos coprodutos fermentados na abundância relativa de diferentes populações bacterianas intestinais, produção de metabólitos microbianos e capacidade antioxidante durante 48 h de fermentação fecal *in vitro*.

Logo, solicitamos a sua colaboração para coletar amostras fecais, como também sua autorização para apresentar os resultados deste estudo em eventos da área da saúde e publicar em revistas científicas. Por ocasião da publicação dos resultados, seu nome será mantido em sigilo.

Informamos que essa pesquisa não oferece riscos previsíveis para a sua saúde. Talvez, possa sentir-se desconfortável com a coleta da amostra, mas será minimizado por meio da coleta em local reservado, com instruções disponibilizadas de forma escrita e verbal.

Por meio da sua participação da sua pesquisa isso trará informações importantes para o meio científico, colaborando com a utilização de coprodutos de frutas que poderão apresentar diversos benefícios para saúde dos consumidores, além de valorizar e incentivar o uso desses materiais que seriam descartados no meio ambiente.

Caso tenha dúvidas em qualquer momento da pesquisa você poderá entrar em contato com o pesquisador ou diretamente com o Comitê de Ética em Pesquisa, por meio dos contatos abaixo.

Endereço e Informações de Contato dos pesquisadores:

Maria Elieidy Gomes de Oliveira

Laboratórios de Bromatologia e Técnica Dietética – Labrom e TD/CCS/UFPB. Fone: (83) 3216-7826

Endereço e Informações de Contato do Comitê de Ética em Pesquisa (CEP/CCS/UFPB)

Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) do Centro de Ciências da Saúde (1º andar) da Universidade Federal da Paraíba Campus I – Cidade Universitária / CEP: 58.051-900 – João Pessoa, Paraíba.

☐ (83) 3216-7791 E-mail: comitedeetica@ccs.ufpb.br

Horário de Funcionamento: de 07h às 12h e de 13h às 16h.

Homepage: <http://www.ccs.ufpb.br/eticaccsufpb>

CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Ao colocar sua assinatura ao final deste documento, **VOCÊ**, de forma voluntária, na qualidade de **PARTICIPANTE** da pesquisa, expressa o seu **consentimento livre e esclarecido** para participar deste estudo e declara que está suficientemente informado(a), de maneira clara e objetiva, acerca da presente investigação. **E receberá uma cópia deste Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE)**, assinada pelo(a) Pesquisador(a) Responsável.

João Pessoa, PB, ____ de _____ de 20__.



Assinatura, por extenso, do(a) Participante da Pesquisa

impressão datiloscópica

Assinatura, por extenso, do(a) Pesquisador(a) Responsável pela pesquisa

APÊNDICE B – ARTIGO I

Exploiting tropical fruit processing coproducts as circular resources to promote the growth and keep the culturability and functionality of probiotic lactobacilli**Abstract**

This study evaluated the use of acerola (*Malpighia glabra* L., CACE), cashew (*Anacardium occidentale* L., CCAS), and guava (*Psidium guayaba* L., CGUA) fruit processing coproducts as substrates to promote the growth, metabolite production, and maintenance of the viability/metabolic activity of the probiotics *Lactobacillus acidophilus* LA-05 and *Lactocaseibacillus paracasei* L-10 during cultivation, freeze-drying, storage, and exposure to simulated gastrointestinal digestion. Probiotic lactobacilli had high viable counts (≥ 8.8 log CFU/mL) and a short lag phase during 24 h of cultivation in CACE, CCAS, and CGUA. Cultivation of probiotic lactobacilli in fruit coproducts promoted sugar consumption, medium acidification, and production of organic acid content over time, besides increasing the contents of several phenolic compounds and antioxidant activity. Probiotic lactobacilli cultivated in fruit coproducts had increased survival rates after freeze-drying and during 120 days of refrigerated storage. Still, Probiotic lactobacilli cultivated and freeze-dried in fruit coproducts had larger subpopulations of live and metabolically active cells when exposed to simulated gastrointestinal digestion. The results showed that fruit coproducts not only optimized the growth and helped to keep the viability and metabolic activity of probiotic strains but also enriched the final fermented products with bioactive compounds, being an innovative circular strategy for producing high-quality probiotic cultures.

Keywords: Fruit coproducts; probiotic; fermentation; bacterial growth; cryoprotectants; biotechnological application.

1. Introduction

Tropical fruit production and commercialization have grown in recent years since consumers have recognized their nutritional properties and presence of bioactive compounds, besides having pleasant sensory characteristics. However, much fruit production is destined for industrial processing that generates agro-industrial coproducts (Sayago-Ayerdi, 2021). Agro-industrial coproducts have received attention due to their high content of nutrients and bioactive compounds, being recognized as valuable biotechnological inputs in a circular reuse strategy (Campos et al., 2020; Can-Cauich et al., 2017), such as substrates in fermentative processes and to formulate new food ingredients with functional properties, including probiotic effects (Araújo et al., 2020; da Silva et al., 2023; Kapoor et al., 2020; Oliveira et al., 2020), to enhance and add value to these matrices (Campos et al., 2020).

Probiotics are live microorganisms that confer health benefits on the host when administered in adequate doses (Salminen et al., 2021). Commercial probiotic production commonly involves several processes, such as fermentation, concentration, stabilization, and storage. The careful choice of the cultivation media plays an important role in this continuous process, ensuring the production of ready-to-use cultures that must be stable in terms of maintaining viability and physiological functions to meet the health claim demands of the food and pharmaceutical industries and consumers (Cheng et al., 2022; Fonseca et al., 2019).

The de Man, Rogosa, and Sharpe (MRS) broth is a widely used culture medium for the laboratory-scale cultivation of probiotic lactobacilli. However, its large-scale commercial application is difficult due to the high cost (Cejas et al., 2017), and more economical alternative cultivation media that allow satisfactory probiotic cell multiplication favoring the production, storage, and maintenance of bacterial viability have been investigated (Araújo et al., 2020; Ayivi, 2022; Śliżewska and Agnieszka, 2020). Acerola (*Malpighia glabra* L.), cashew (*Anacardium occidentale* L.), and guava (*Psidium guayaba* L.) are tropical fruits widely used

by the agro-food sector to produce a variety of derived food products, resulting in the formation of coproducts mainly formed by peels and seeds (Ferreira et al., 2021) rich in vitamins, proteins, soluble and insoluble fibers, phenolic compounds, and with high antioxidant activity (Angulo-López et al., 2021; Ferreira et al., 2021; Sá et al., 2020). A previous study showed that acerola, cashew, and guava coproducts exerted protective effects on *Lactocaseibacillus paracasei* L-10 and *Lactocaseibacillus casei* L-26 during freeze-drying and storage, and the reported cryoprotective effects were primarily linked to the presence of sugars, oligosaccharides (fructooligosaccharides), and phenolic compounds found in these coproducts (Araújo et al., 2020). However, studies evaluating the use of tropical fruit processing coproducts as substrates for culturing probiotics and their impacts on the survival, culturability, and functionality of these microorganisms in an integrative approach from cultivation until long-term storage and challenge with harsh conditions found during passage through the gastrointestinal tract are still scarce.

Considering that advances in biotechnology have driven the search for alternative cultivation media that meet the growing demands for high-quality and sustainable probiotic products, this study investigated the use of acerola, cashew, and guava processing coproducts as resources to promote the growth, metabolite production, and/or maintenance of the viability and functionality of the probiotics *L. acidophilus* LA-05 and *L. paracasei* L-10 during cultivation, freeze-drying, storage, and exposure to simulated gastrointestinal digestion.

2. Material and methods

2.1 Preparation and physicochemical characterization of tropical fruit processing coproducts

Acerola (*Malpighia glabra* L., CACE), cashew (*Anacardium occidentale* L., CCAS), and guava (*Psidium guajava* L., CGUA) coproducts, consisting of peels, seeds, and small amounts of pulp, were obtained from a local fruit processing industry (João Pessoa, PB, Brazil).

Different batches were collected, totaling six kg of each coproduct. The samples were frozen (-18 ± 2 °C for 48 h) and freeze-dried using a benchtop freeze dryer (LI-101 model; LIOTOP®, São Carlos, SP, Brazil; freeze-drying conditions: -55 ± 2 °C, vacuum pressure <138 µHG, and freeze-drying speed 1 mm/h, for approximately 12 h) (Araújo et al., 2020). The freeze-dried material was crushed using a household grinder and sieved through a fine mesh (<1.0 mm). The freeze-dried coproducts were stored at -18 ± 2 °C in commercially sterilized hermetically sealed laminated polypropylene bags for a maximum period of 15 days until use in the experiments.

The physicochemical parameters of the freeze-dried coproducts were determined using standard procedures (AOAC, 2019) to obtain the moisture, ash, protein, and lipid contents. Water activity (a_w) was determined using an Aqualab water activity meter (Novasina, Aqualab®, Series Model 3TE, USA). The physicochemical parameters of the freeze-dried acerola, cashew, and guava coproducts used in this study are shown in Table 1 (Araújo et al., 2020).

2.2 Microorganisms, preparation of culture media, culture conditions, and growth kinetics

Two well-known probiotic lactobacilli strains were tested in this study, namely *Lactobacillus acidophilus* LA-05 and *Lacticaseibacillus paracasei* L-10 (Araújo et al., 2020; Duarte et al., 2017). For inoculum preparation, each strain was firstly grown anaerobically (Anaerogen System Anaerogen, Oxoid, Wade Road, Basingstoke, UK) in de Man, Rogosa and Sharpe broth (MRS; HiMedia, Mumbai, India) at 37 ± 1 °C for 24 h, followed by new cultivation under the same conditions until reaching the stationary growth phase (20 - 24 h) (Araújo et al., 2020). These suspensions had viable cell counts of approximately $10 \log$ CFU/mL [with optical density (OD) reading at 625 nm (OD₆₂₅) corresponding to 1.5] when plated on MRS agar (HiMedia).

The freeze-dried coproducts were individually suspended in sterilized distilled water (5%, w/v) (Quintana et al., 2017), homogenized using a Turratec apparatus (model TE-102, Tecnal, Piracicaba, SP, Brazil) and autoclaved (15 min, 121 °C, 1 atm). The suspensions were subsequently used as cultivation media, namely CACE (acerola coproduct), CCAS (cashew coproduct), and CGUA (guava coproduct).

The probiotic strains were individually inoculated into 100 mL of each tested culture (fermentation) medium at a concentration of 2% (v/v) and incubated at 37 ± 1 °C under shaking (200 rpm) for 24 h. MRS broth was used as a control culture medium under the abovementioned conditions. The growth of probiotic culture was monitored by counting viable cells and determining the pH (AOAC, 2019) after zero (immediately after homogenization), 6, 12, 18 and 24 h. An aliquot (100 µL) was removed from each culture medium containing the probiotic strain at each fermentation time interval, and used to determine the viable cell count. Serial dilutions were performed (1:9 v/v, 10^{-1} - 10^{-6}) using sterilized saline solution (NaCl 8.5 g/L), an aliquot from each dilution (100 µL) was inoculated on MRS agar, and incubated (37 ± 1 °C, 48 h) under anaerobiosis (Anaerobic System Anaerogen). The results were expressed as a log of colony-forming units per milliliter (log CFU/mL).

The results from pH values and viable cell counts were adjusted according to Eq. 1 to determine the lag phase duration and acidification rate (Romano et al., 2016):

$$pH(t) = \frac{pH_0 - pH_f}{1 + \frac{t^p}{c}} + pH_f \quad (Eq. 1)$$

Where t is the time in h, pH_0 is the pH of the culture medium at time zero, pH_f is the pH of the culture medium when the stationary phase is reached, c is the time corresponding to the inflection point, and p is an exponential adjustment factor. The lag phase was calculated as the intersection between the tangent line at $t=c$ and pH_0 . The acidification rate during the exponential phase was calculated as the magnitude of the tangent line slope.

2.3 Assessment of the bacterial metabolic activity during fermentation

The metabolic activity of the probiotic strains was evaluated by determining the sugar and organic acid contents in the culture media at different fermentation intervals, i.e., zero (immediately after homogenization), 12, and 20 h. The soluble and insoluble fiber contents, phenolic compounds, antioxidant activity, and global metabolic profiling were determined at zero and 20 h of fermentation. The time of up to 20 h of fermentation was selected to assess bacterial metabolic activity, as it corresponded to the point at which strains of *L. acidophilus* LA-05 and *L. paracasei* L-10 reached the stationary growth phase, representing the peak of their metabolic activity in the culture media under investigation.

2.3.1 Determination of the sugar, organic acid, and phenolic compound contents

Initially, aliquots (2 mL) of the different fermentation media were centrifuged ($4,000 \times g$, 15 min, 4 °C), and the supernatants were filtered with a 0.45 µm filter (Millex Millipore, Barueri, SP, Brazil) to determine the contents of sugars and organic acids. In turn, aliquots (5 mL) of the different culture media were homogenized with 80% methanol (5 mL, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA), centrifuged ($9000 \times g$, 15 min, 4 °C), and the supernatants were filtered through a 0.45 µm filter (Millex Millipore) to determine the contents of phenolic compounds. The contents of sugars, organic acids, and phenolic compounds were determined with high-performance liquid chromatography using a liquid chromatograph (model 1260 Infinity LC, Agilent Technologies, St. Clara, CA, USA) and previously described analytical conditions (Coelho et al., 2018; Padilha et al., 2017). The data were processed using the OpenLAB CDS ChemStation Edition software (Agilent Technologies). HPLC sample peaks were identified by comparing their retention times with sugar and organic acid standards (Sigma Aldrich). Average peak areas were considered to quantify sugars and organic acids (Coelho et

al., 2018; Padilha et al., 2017). The results were expressed in mg of phenolic compounds per liter of culture medium (mg/L).

2.3.2 Determination of dietary fiber content and antioxidant activity

The insoluble and soluble fiber contents of the different cultivation media were determined using an enzymatic-gravimetric method (Horwitz et al., 2005). An aliquot (2 mL) of each culture medium was homogenized with 70% methanol (10 mL, Sigma-Aldrich), kept at rest for 24 h at room temperature (25 ± 1 °C), and filtered through a 125 mm filter (Whatman, GE Healthcare, Chicago, IL, USA). The antioxidant activity was evaluated using the ABTS (2,2-azino-bis-3-ethylbenzthiazoline-6-sulfonic acid), DPPH (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl), and FRAP (ferric-reducing ability of plasma) methods. A microplate spectrophotometer (BioTek Eon, Winooski, VT, USA) was used to read the absorbance at wavelengths of 734, 517, and 595 nm, respectively (Nascimento et al., 2022; Paula et al., 2022). The results were expressed in Trolox μmol equivalent per gram of sample ($\mu\text{mol TEAC/g}$) for the ABTS and DPPH methods and expressed in μmol of ferrous sulfate equivalents per g of sample ($\mu\text{mol FeSO}_4/\text{g}$) for the FRAP method.

2.3.3 Global metabolic profiling

The global metabolic profiling of the culture media was determined using the Nuclear Magnetic Resonance (NMR) technique. An aliquot (550 μL) of each fermented culture medium was diluted with deuterium oxide (50 μL) with 0.01% TSP (tetramethylsilylpropanoic acid- d_4 sodium salt) and placed in a tube (5 mm in diameter) for NMR analysis. The NMR experiments were performed on a Bruker Ascend 400 NMR operating at 400 MHz for ^1H -NMR and 100 MHz for ^{13}C -NMR (Bruker, Billerica, MA, USA). The following parameters were used to obtain the spectrum sequence: noesygppr1d; temperature: 26 °C; number of scans: 32; scan

dummer: 4; receiver gain: 58.8; acquisition time: 4.08 s. Spectra were processed using the Bruker TopSpin 4.1.1 software program (Sampaio *et al.*, 2022).

2.4 Evaluation of the effects of fruit coproducts on the probiotic culturability after freeze-drying and during refrigerated storage

An aliquot (1 mL) of each culture medium (CACE, CCAS, and CGUA) containing *L. acidophilus* LA-05 or *L. paracasei* L-10 at the stationary growth phase (after 20 h of cultivation) was neutralized with sodium hydroxide (NaOH; 0.1 M) until reaching pH 7 and transferred to a glass vial under aseptic conditions. In turn, cultures in MRS broth (control) were neutralized and resuspended in phosphate buffer saline (PBS; 0.1 M; pH 7.4) (Quintana *et al.*, 2017). The strains grown in each culture medium were frozen (-18 °C, 24 h) and freeze-dried (temperature of -55 ± 2 °C, with vacuum pressure <138 µHG, freeze-drying rate of 1 mm/h), for approximately 40 h using a benchtop freeze dryer (Liotop) (Garcia *et al.*, 2018).

The freeze-dried strains were kept in desiccators with silica gel and stored under refrigeration (4 ± 0.5 °C) for 120 days (Sampaio *et al.*, 2021). After freeze-drying, viable cell counts were determined at zero (immediately after freeze-drying), 30, 60, and 120 days of refrigerated storage. For this, the strains were rehydrated with sterilized distilled water (1:9 v/v, 15 min, 25 ± 1 °C), serial dilutions (1:9 v/v, $10^{-1} - 10^{-6}$) in sterilized saline solution (NaCl 8.5 g/L) were prepared, and an aliquot (10 µL) from each dilution was plated on MRS agar and anaerobically incubated (37 °C, 48 h, Anaerogen Anaerobic System). The results were expressed as log CFU/mL. Furthermore, the survival rate after freeze-drying was calculated using the equation (Bagad *et al.*, 2017):

$$\text{Survival rate (\%)} = \frac{\text{CFU after freeze-drying}}{\text{CFU before freeze-drying}} \times 100\% \text{ (Eq. 2)}$$

2.5 Enumeration of viable cell counts of probiotics during simulated gastrointestinal digestion

The probiotic strains cultivated in the different media were subjected to simulated gastrointestinal digestion immediately after freeze-drying and at 120 days of refrigerated storage (4 ± 0.5 °C). The freeze-dried strains were rehydrated with sterilized distilled water (1:9 w/v; 25 ± 1 °C; 10 min) before starting the simulated gastrointestinal digestion. The oral condition was simulated using 100 U/mL of α -amylase diluted in 1 mM CaCl_2 and pH adjusted to 6.9 with 1 M NaHCO_3 (exposure time of 2 min, 200 rpm). The stomach phase was simulated using pepsin (25 mg) diluted in 0.1 M HCl (1 mL, 0.05 mL/mL sample ratio, exposure time 120 min, 37 ± 1 °C, 130 rpm). The intestinal phase was mimicked with pancreatin/L 0.1 M NaHCO_3 (2 g) and bovine bile salts (12 g/L) diluted in 0.1 M NaHCO_3 , and the pH adjusted to 6.0 (0.25 mL/mL of the sample, exposure time 120 min, 37 °C, 45 rpm) (de Albuquerque et al., 2018). Reagents, enzymes, and bovine bile salts were purchased from Sigma-Aldrich.

The probiotic viable cell counts were determined after exposure to each step of the simulated gastrointestinal digestion. For this, aliquots (100 μL) were taken from each simulated gastrointestinal phase, serially diluted (1:9 v/v, $10^{-1} - 10^{-6}$) in sterilized saline solution (NaCl 8.5 g/L), aliquots (10 μL) of each dilution were inoculated on MRS agar, and incubated anaerobically (37 ± 1 °C, 48 h, Anaerogen, Oxoid Anaerobic System). The results were expressed as log CFU/mL.

2.6 Assessment of the of probiotic cells after freeze-drying and during exposure to simulated gastrointestinal digestion

The flow cytometry (FC) technique was used to monitor the physiological status of probiotic cells cultivated in different media immediately after freeze-drying, at 120 days of refrigerated storage (4 ± 0.5 °C), and during exposure to each step of the simulated

gastrointestinal digestion. The freeze-dried strains (immediately after freeze-drying and at 120 days of storage) were initially rehydrated with sterilized distilled water (2 mL, 10 min, 25 ± 1 °C), and aliquots taken from each simulated gastrointestinal phase. These samples were filtered with a 1.0 µm PVDF filter (Analysis, São Paulo, SP, Brazil), centrifuged ($4500 \times g$, 10 min, 4 °C), and washed twice with PBS ($4500 \times g$, 10 min, 4 °C). Double labeling with propidium iodide (PI, Sigma-Aldrich, 10 µg/mL, 25 ± 1 °C, 15 min) and carboxyfluorescein diacetate (cFDA, Sigma-Aldrich, 2.5 µg /mL, 25 ± 1 °C, 15 min) was performed to evaluate membrane integrity and cellular metabolic activity, respectively, as previously described (Gandhi and Shah, 2015; Sträuber and Müller, 2010). Subpopulations of cells characterized as PI-cFDA+ were considered as non-permeabilized with enzymatic activity (live cells), PI+cFDA+ were considered permeabilized without enzymatic activity (dead cells), and PI-cFDA- were considered as unstained cells (Paparella et al., 2008). The analyses were conducted on a flow cytometer with argon laser emission at 488 nm (BD Accuri C6, Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ, USA) operating under previously described analytical conditions (de Sousa Guedes and de Souza, 2018). The results were expressed as the percent of cell subpopulations stained in each detector.

2.7 Statistical analysis

The experiments were performed in triplicate on three distinct occasions. The results were expressed as average $\pm$ standard deviation. The Shapiro-Wilk normality test checked the data normal distribution. The statistical analysis was performed using the Student's t-test or analysis of variance (ANOVA) followed by Tukey's test to determine differences ($P < 0.05$). NMR spectra processing was performed using the TopSpin 4.1.1 software program. The NMR spectra were subjected to referencing, baseline correction, phase correction, alignment, removal of the water peak at 5.07-4.60 ppm for normalization by the total spectrum area, and obtaining

the binning spectrum with a range from 0.00 to 9.00 ppm and with buckets of 0.020 ppm. Principal component analysis (PCA) and hierarchical cluster analysis (HCA) were performed using the Past software program (version 4.03). The data obtained from the binning spectrum were subjected to area normalization, and the PCA data were obtained by cross-validation.

3. Results

3.1 Growth kinetics of probiotic lactobacilli during fermentation

The results of growth kinetics showed that the viable counts of *L. acidophilus* LA-05 and *L. paracasei* L-10 were overall higher in CACE, CCAS, and CGUA than in the control medium (MRS broth) ($P < 0.05$). *L. acidophilus* LA-05 and *L. paracasei* L-10 had higher viable cell counts in CGUA and CACE than in CCAS ($P < 0.05$). The exponential growth of *L. acidophilus* LA-05 and *L. paracasei* L-10 in CGUA and CACE occurred until 24 h of fermentation, while occurring until 18 h of fermentation in CCAS and control medium. The viable cell counts of *L. acidophilus* LA-05 and *L. paracasei* L-10 at 24 h of fermentation did not differ ($P \geq 0.05$; 9.9 ± 0.14 log CFU/mL) in CGUA, while viable cell counts of 9.83 ± 0.17 and 9.86 ± 0.20 log CFU/mL and 8.96 ± 0.24 and 8.80 ± 0.14 log CFU/mL were found in CACE and CCAS, respectively (Fig. 1A-B).

The pH in all inoculated media was reduced over time, indicating the capacity of *L. acidophilus* LA-05 and *L. paracasei* L-10 of fermenting CACE, CCAS, and CGUA. CACE, CCAS, and CGUA were more acidic (4.15 ± 0.09 , 4.18 ± 0.01 , and 4.35 ± 0.14 , respectively) than the control medium (6.02 ± 0.05) at time zero (Fig. 1C-D). This difference in initial pH may have contributed to the greatest acidification rates in the control medium fermented with *L. acidophilus* LA-05 and *L. paracasei* L-10 (0.11 and 0.10 pH units/h, respectively) (Table 2). However, only CACE, CCAS, and CGUA had pH < 4.0 at the end of the fermentation period (Fig. 1C-D).

L. acidophilus LA-05 and *L. paracasei* L-10 had a shorter lag time in CACE and CGUA (1.36 and 1.22 h; 1.11 and 2.10 h, respectively) than in the control medium (4.27 and 2.44 h, respectively) and CCAS (6.20 and 7.30 h, respectively) (Table 2). The acidification rate was higher in CGUA fermented with *L. acidophilus* LA-05 and *L. paracasei* L-10 (0.03 and 0.03 pH units/h, respectively), followed by CACE (0.02 and 0.03 pH units/h, respectively) and CCAS (0.01 and 0.01 pH units/h, respectively) (Table 2).

3.2 Metabolic activity of probiotic lactobacilli during fermentation

CCAS had higher glucose contents ($P < 0.05$) (9.13-9.17 g/L) than CACE (4.37-4.83 g/L) and CGUA (2.75-3.90 g/L) at time zero (Table 3), when fermented by both probiotic lactobacilli. Fructose was the most predominant sugar in CCAS, CACE, and CGUA, with CCAS having the highest fructose content (9.23-10.19 g/L, $P < 0.05$), followed by CACE (6.75-7.73 g/L) and CGUA (5.30-6.53 g/L). *L. acidophilus* LA-05 and *L. paracasei* L-10 consumed glucose and fructose available in CCAS, CACE, and CGUA since their contents were reduced ($P < 0.05$) during fermentation (Table 3).

Lactic acid was overall the main organic acid produced by *L. acidophilus* LA-05 and *L. paracasei* L-10 after 20 h of fermentation (stationary phase), and its contents increased ($P < 0.05$) over time regardless of the cultivation medium. However, higher lactic acid contents were found in CGUA (3.84 g/L) and control medium (17.95 g/L) inoculated with *L. acidophilus* LA-05 at the end of the measured fermentation period compared to time zero ($P < 0.05$). Acetic acid content increased ($P < 0.05$) in all culture medium tested during fermentation, except when CCAS was fermented by *L. acidophilus* LA-05, where a reduction ($P < 0.05$) in this organic acid was observed after 20 h of fermentation. Citric acid content decreased ($P < 0.05$) during fermentation regardless of the cultivation medium. Succinic acid content varied with the

probiotic strain and culture medium tested during fermentation, with this organic acid being predominant only in CCAS (7.37 - 8.84 g/L).

CACE, CCAS, and CGUA had a relevant soluble and insoluble dietary fiber content, with an increase in their contents ($P < 0.05$) at 20 h of fermentation compared to time zero, except for soluble fiber content that did not differ in CCAS and CGUA ($P \geq 0.05$), when fermented by *L. paracasei* L-10. The content of insoluble fiber (2.80 ± 0.12 to 4.40 ± 0.15 g/100 g) was higher than of soluble fiber after 20 h of fermentation (Table 4).

The global metabolic profile of the different media inoculated with *L. acidophilus* LA-05 and *L. paracasei* L-10 identified distinct sugars and organic acids at 20 h of fermentation. Sugars, such as fructose, β -glucose, and α -glucose, as well as metabolites from sugar metabolism, such as lactic acid/lactate, acetic acid/acetate, and ethanol, were detected in these media during fermentation. PCA results (Fig. 1) located the fermentation media in the different quadrants to group and/or move away according to the intensity of the spectra signals of the detected compounds. CCAS fermented with *L. acidophilus* LA-05 and *L. paracasei* L-10, and CACE fermented with *L. acidophilus* LA-05 were located in the upper right quadrant with higher sugar contents at 20 h of fermentation. In contrast, CGUA fermented with *L. acidophilus* LA-05 and *L. paracasei* L-10, and CACE fermented with *L. paracasei* L-10 were located in the lower left quadrant, indicating the detection of lactic acid, acetic acid, and ethanol at 20 h of fermentation. HCA results (Fig. 3) showed similarities in the metabolic profile between CCAS fermented with *L. acidophilus* LA-05 and *L. paracasei* L-10 and CACE fermented with *L. acidophilus* LA-05. On the other hand, there was a similarity in the metabolic profile of CGUA fermented with *L. acidophilus* LA-05 and *L. paracasei* L-10 and CACE fermented by *L. paracasei* L-10.

Several phenolic compounds were detected in the media fermented with *L. acidophilus* LA-05 and *L. paracasei* L-10 (Table 5). Procyanidin B2, quercetin-3-glucoside, rutin, and

isorhamnetin were the phenolic compounds found at time zero and 20 h of fermentation of CACE, CCAS, and CGUA. In turn, procyanidin A2 was found only at 20 h of fermentation in all media fermented with *L. acidophilus* LA-05 and *L. paracasei* L-10, indicating its production due to the probiotic fermentative activity. Similarly, procyanidin B1 was detected in all culture media only after 20 hours of fermentation, whereas catechin was detected after 20 hours of fermentation only in CCAS and CGUA. Other phenolic compounds, such as hesperidin, cis-resveratrol, and trans-resveratrol, were detected only in CCAS fermented with *L. acidophilus* LA-05 and *L. paracasei* L-10. Rutin and isorhamnetin contents increased in CACE, and cis-resveratrol, procyanidin B2, and rutin contents increased in CCAS ($P < 0.05$) during fermentation.

The antioxidant activity increased ($P < 0.05$) in CACE, CCAS, CGUA, and control media fermented with *L. acidophilus* LA-05 and *L. paracasei* L-10 (Table 6). CACE had overall the highest antioxidant activity ($P < 0.05$) after 20 h of fermentation, especially in the media fermented with *L. paracasei* L-10 and when the antioxidant activity was measured with the FRAP method ($157.40 \mu\text{mol FeSO}_4/\text{g}$). The presence of phenolic compounds during fermentation, as well as the increase in their contents in CACE, CCAS, and CGUA, may be linked to the increased antioxidant activity in these media during fermentation.

3.3 Culturability, survival, and physiological status of probiotic lactobacilli during fermentation, freeze-drying, storage, and exposure to simulated gastrointestinal digestion

The effects of freeze-drying on the culturability (log CFU/mL), viable cell count reduction (log CFU/mL), and survival rate (%) of *L. acidophilus* LA-05 and *L. paracasei* L-10 during fermentation of the different media were also evaluated (Table 7). *L. acidophilus* LA-05 and *L. paracasei* L-10 had high viable cell counts (8.76 to 9.85 log CFU/mL) in the different

tested media before freeze-drying, and these counts were reduced after freeze-drying ($P < 0.05$, 0.29 to 1.86 log CFU/mL).

However, *L. acidophilus* LA-05 and *L. paracasei* L-10 cultivated in CACE, CCAS, and CGUA kept their culturability after freeze-drying with higher viable cell counts ($P < 0.05$; 7.77 to 9.45 log CFU/mL) than when cultivated in the control medium (7.08 to 7.15 log CFU/mL). The lowest survival rates ($P < 0.05$) after freeze-drying were detected when *L. acidophilus* LA-05 and *L. paracasei* L-10 were cultivated in the control medium, i.e. 78.26% and 80.76%, respectively. The highest viable cell counts (9.35-9.45 log CFU/mL) and the highest survival rates (95.84 - 96.97%) after freeze-drying were detected when the probiotic strains were cultivated in CGUA ($P < 0.05$). These results indicate that cultivating *L. acidophilus* LA-05 and *L. paracasei* L-10 in CACE, CCAS, and CGUA resulted in probiotic cell protection during freeze-drying.

The viable cell counts (log CFU/mL) of *L. acidophilus* LA-05 and *L. paracasei* L-10 cultivated and freeze-dried in the different media were determined during 120 days of refrigerated storage (Fig. 4). *L. acidophilus* LA-05 and *L. paracasei* L-10 cultivated and freeze-dried in CACE, CCAS, and CGUA had overall higher viable cell counts (4.75 ± 0.35 to 9.55 ± 0.21 log CFU/mL) during storage than when cultivated and freeze-dried in the control medium (3.85 ± 0.21 to 7.15 ± 0.21 log CFU/mL) (Fig. 4A-B). The viable cell counts of *L. acidophilus* LA-05 decreased ($P < 0.05$) during storage regardless of the culture medium. At 120 days of storage, the viable cell counts of *L. acidophilus* LA-05 cultivated and freeze-dried in CACE (6.30 ± 0.28 log CFU/mL) and CGUA (6.65 ± 0.21 log CFU/mL) were higher ($P < 0.05$) than when cultivated and freeze-dried in CCAS (4.85 ± 0.35 log CFU/mL) and control medium (4.33 ± 0.25 log CFU/mL) (Fig. 4A).

The viable cell counts of freeze-dried *L. paracasei* L-10 decreased during storage ($P < 0.05$) regardless of the cultivation medium. More pronounced reductions occurred until 30 days

of storage, especially when *L. paracasei* L-10 was cultivated and freeze-dried in the control medium and CCAS (reductions of 1.36 ± 0.04 and 1.25 ± 0.36 log CFU/mL, respectively). *L. paracasei* L-10 cultivated and freeze-dried in CCAS, as well as in the control medium, had reductions of ≥ 3 log CFU/mL at 120 days of storage.

At 120 days of storage, the viable cell counts of *L. paracasei* L-10 cultivated and freeze-dried in CACE (6.95 ± 0.21 log CFU/mL) and CGUA (6.85 ± 0.35 log CFU/mL) were higher ($P < 0.05$) than in the control medium (3.85 ± 0.21 log CFU/mL) and CCAS (4.75 ± 0.35 log CFU/mL) (Fig. 4B). Overall, *L. paracasei* L-10 cultivated and freeze-dried in CACE, CCAS, and CGUA had smaller viable cell count reductions during storage than when cultivated and freeze-dried in the control medium ($P < 0.05$), standing out the viable cell counts of ≥ 6 log CFU/mL when the strains were cultivated and freeze-dried in CACE and CGUA during the measured storage period.

L. acidophilus LA-05 and *L. paracasei* L-10 cultivated and freeze-dried in the different tested media were exposed to simulated gastrointestinal digestion at days 1 and 120 of refrigerated storage (Fig. 5). *L. acidophilus* LA-05 and *L. paracasei* L-10 cultivated and freeze-dried in CACE, CCAS, and CGUA had overall higher viable cell counts ($P < 0.05$) than when cultivated and freeze-dried in the control medium during the simulated gastrointestinal digestion.

At day 1 of refrigerated storage, *L. acidophilus* LA-05 and *L. paracasei* L-10 ($P < 0.05$) cultivated and freeze-dried in CACE had higher viable cell counts (6.88 ± 0.14 and 8.35 ± 0.16 log CFU/mL, respectively) when exposed to simulated mouth conditions than when cultivated and freeze-dried in CGUA (6.64 ± 0.32 and 7.96 ± 0.21 log CFU/mL, respectively), CCAS (5.89 ± 0.12 and 6.27 ± 0.05 log CFU/mL, respectively) and control medium (5.65 ± 0.16 and 6.75 ± 0.29 log CFU/mL, respectively) (Fig. 5A and 5C). After exposure to the simulated gastric conditions (pH 2.0), *L. acidophilus* LA-05 and *L. paracasei* L-10 (Fig. 5A and 5C)

cultivated and freeze-dried in CCAE, CGUA, and CCAS had higher viable cell counts ($P < 0.05$, viable cell counts >5 CFU/mL) than when cultivated and freeze-dried in the control medium (counts <4 CFU/mL). Similarly, after exposure to the simulated intestinal conditions (pH 6.0), *L. acidophilus* LA-05 and *L. paracasei* L-10 cultivated and freeze-dried in CACE, CCAS and CGUA had higher viable cell counts ($P < 0.05$; 4.50 ± 0.06 to 5.22 ± 0.11 log CFU/mL) than when cultivated and freeze-dried in the control medium (2.64 ± 0.34 to 3.51 ± 0.04 log CFU/mL) (Fig. 5A and 5C).

At 120 days of refrigerated storage, *L. acidophilus* LA-05 and *L. paracasei* L-10 cultivated and freeze-dried in CACE and CGUA had higher viable cell counts ($P < 0.05$; 6.30 ± 0.14 to 6.70 ± 0.14 log CFU/mL) after exposure to simulated mouth conditions than when cultivated and freeze-dried in CCAS (4.96 ± 0.22 and 4.65 ± 0.07 log CFU/mL, respectively) and control medium (4.49 ± 0.01 and 3.60 ± 0.14 log CFU/mL, respectively) (Fig. 5B and 5D), *L. acidophilus* LA-05 and *L. paracasei* L-10 (Fig. 5B and 5D) cultivated and freeze-dried in CCAE, CCAS, and CGUS had higher viable cell counts after exposure to simulated gastric conditions (pH 2.0) ($P < 0.05$; viable cell counts > 4 CFU/mL) than when cultivated and freeze-dried in the control medium (viable cell counts < 3.5 CFU/mL). Similarly, *L. acidophilus* LA-05 and *L. paracasei* L-10 cultivated and freeze-dried in CACE, CCAS, and CGUA had higher viable cell counts after exposure to simulated intestinal conditions (pH 6.0) ($P < 0.05$; 3.70 ± 0.28 to 5.70 ± 0.28 log CFU/mL) than when cultivated and freeze-dried in the control medium (1.75 ± 0.35 to 2.31 ± 0.28 log CFU/mL) (Fig. 5B and 5D).

At 1 and 120 days of refrigerated storage the membrane integrity and metabolic activity (cell functionality) of *L. acidophilus* LA-05 and *L. paracasei* L-10 cultivated and freeze-dried in different media and further exposed to simulated gastrointestinal digestion were evaluated (Fig. 6). At 1 day of refrigerated storage and before exposure to simulated gastrointestinal conditions, *L. acidophilus* LA-05 and *L. paracasei* L-10 cultivated and freeze-dried in CACE,

CCAS, and CGUA had live cell subpopulation sizes (PI-cFDA+) ranging from 3.0 to 16.8% (Fig. 6A and 6C), with the lowest live cell subpopulation size ($P < 0.05$) found for *L. acidophilus* LA-05 cultivated and freeze-dried in the control medium (0.3%).

The most notable changes in the physiological status of cells during exposure to simulated gastrointestinal conditions occurred after exposure to simulated gastric conditions, in which *L. acidophilus* LA-05 and *L. paracasei* L-10 cultivated and freeze-dried in CACE, CCAS, and CGUA had live cell subpopulation sizes ranging from 0.8 to 2.2% (Fig. 6A and 6C). *L. acidophilus* LA-05 and *L. paracasei* L-10 cultivated and freeze-dried in CACE (16.5% and 18.8%, respectively), CGUA (10.1% and 12.1%, respectively), and CCAS (9.1% and 7.7%, respectively) had higher live cell subpopulations at the end of the simulated gastrointestinal digestion (intestinal phase) than when cultivated and freeze-dried in the control medium ($P < 0.05$). *L. acidophilus* LA-05 and *L. paracasei* L-10 cultivated and freeze-dried in the control medium (37.5 to 48.7%) had the largest sizes of dead cell subpopulations at the end of the simulated gastrointestinal digestion (Fig. 6A and 6C).

At 120 days of refrigerated storage, *L. acidophilus* LA-05 cultivated and freeze-dried in CACE, CCAS, and CGUA (16.4 to 28.2%) had the highest live cell subpopulation sizes after exposure to simulated gastric conditions ($P < 0.05$) (Fig. 6B and 6D). *L. acidophilus* LA-05 cultivated and freeze-died in the control medium (60.7%) and *L. paracasei* L-10 freeze-dried and cultivated in CGUA (53.8%) had the highest dead cell subpopulation sizes ($P < 0.05$) at the end of the simulated gastrointestinal digestion. However, at 120 days of refrigerated storage, *L. paracasei* L-10 cultivated and freeze-dried in CGUA had higher viable cell counts ($P < 0.05$; 5.25 ± 0.21 log CFU/mL) at the end of the simulated gastrointestinal digestion than when cultivated and freeze-dried in the control medium (1.75 ± 0.35 log CFU/mL) (Fig. 5D).

These results overall demonstrate improved cell protection of *L. acidophilus* LA-05 and *L. paracasei* L-10 cultivated and freeze-dried in CACE, CCAS, and CGUA at 1 and 120 days of refrigerated storage when exposed to simulated gastrointestinal digestion.

4. Discussion

Lactobacilli probiotic cultivation has traditionally been conducted in conventional culture media, often rich in ingredients of animal origin, such as whey, or based on vegetable and synthetic substrates dependent on finite natural resources. Alternative cultivation media must not only offer a more environmentally friendly approach but also advantages in terms of cost, scalability, and product security. In this context, coproducts originating from the food industry have been proposed as substrates for fermentation by probiotic bacteria to produce more economical cultivation media and high-value-added molecules from probiotic metabolism (Cejas et al., 2017; Duarte et al., 2017; Genevois et al., 2016; Quintana et al., 2017).

The results of this study showed the positive impacts of culture media containing acerola, cashew, and guava coproducts on the growth and metabolic characteristics of probiotics *L. acidophilus* LA-05 and *L. paracasei* L-10. These results are important for probiotic culture production in terms of growth efficiency and metabolic quality. The nutritional richness and availability of nutrients in CCAS, CGUA, and CACE allowed rapid adaptation of these probiotics in the culture media, with viable cell counts varying from 8.8 to 9.9 log CFU/mL at 24 h of fermentation. The lower viable cell counts of *L. acidophilus* LA-05 and *L. paracasei* L-10 in CCAS could be explained due to the lower protein and lipid concentrations detected in this fruit coproduct, promoting less protection and, consequently, less multiplication of these strains when compared to the culture media containing CGUA and CACE. Doses of 6 to 8 log CFU/g (or mL) have been commonly reported as minimal for probiotics incorporated into a food or formulation to produce consumer health benefits (Hill et al., 2014; Sampaio et al.,

2021). The cultivation of *L. acidophilus* LA-05 and *L. paracasei* L-10 in CCAS, CGUA, and CACE generated fermented products with viable cell counts above the minimal recommended doses to achieve health-beneficial effects. Furthermore, the high availability and low commercial value of these agro-industrial coproducts should represent an advantage for producing probiotic cultures on a large scale since production costs can be reduced with their use in biotechnological processes (Reddy et al., 2021).

Considering the aforementioned aspects, as well as the importance of choosing appropriate media for cultivating probiotic bacteria on a large scale, the use of fruit coproducts could be a promising and sustainable strategy to this end. Obtaining fermented products with high *L. acidophilus* LA-05 and *L. paracasei* L-10 viable counts, combined with the economic advantage provided by re-using fruit coproducts, highlights the potential feasibility of these cultivation media in large-scale biotechnological processes. The choice of these substrates not only strengthens the effectiveness of probiotic products but also contributes to optimizing production costs, reinforcing an economically viable and ecologically sustainable approach with potential application in the food and pharmaceutical industries (Chamorro et al., 2022; Ruiz Rodríguez et al., 2021).

Cultivating *L. acidophilus* LA-05 and *L. paracasei* L-10 in CCAS, CGUA, and CACE resulted in a shorter lag time and media acidification with lower pH values at the end of the measured fermentation period. Furthermore, the capability of these media to prolong the exponential growth of the tested probiotics until 24 h suggests greater bacterial efficiency in using available nutrients during fermentation. Cultivation conditions, and especially the media composition, can interfere with microbial growth kinetic parameters, i.e., the lag time duration, maximum growth rate, and population density when reaching the stationary growth phase (Śliżewska and Chlebicz-Wójcik, 2020). The lag phase refers to the growth curve stage where metabolic adaptations occur, and bacterial strains can grow in a new environment, although the

lag phase can be extended under sublethal stress (Bisson et al., 2021). In this study, the lag phase was longer when *L. acidophilus* LA-05 and *L. paracasei* L-10 were cultivated in CCAS, with a lower acidification rate (pH units/h) and, consequently, a higher final pH. These results agree with the lower viable cell counts of *L. acidophilus* LA-05 and *L. paracasei* L-10 in CCAS, possibly due to the nutritional composition of this coproduct.

Fructose was the sugar most predominant in all culture media, followed by glucose and maltose. The fermentation of CACE, CCAS, and CGUA by *L. acidophilus* LA-05 and *L. paracasei* L-10 decreased the initial sugar contents and increased the organic acid contents, especially of lactic acid and acetic acid contents in CACE and CGUA. A previous study showed that *L. acidophilus* LA-5 and *Lacticaseibacillus casei* 01 fermented fruit purees (*Spondias purpurea* L. [seriguela], *Hancornia speciosa* [mangaba], *Mangifera indica* L. var. 'Rosa' [rose mango], and *Malpighia emarginata* D.C. [acerola]), resulting in a reduction in initial pH values and glucose and fructose contents, with a consequent increase in lactic acid and acetic acid contents (de Assis et al., 2021). Glucose is the preferred carbon source during bacterial fermentation when compared to fructose and other sugars; however, *L. acidophilus* LA-05 and *L. paracasei* L-10 were capable of metabolizing both glucose and fructose during CACE, CCAS, and CGUA fermentation without negatively impacting bacterial multiplication (Menezes et al., 2021; Mousavi and Mosavi, 2019).

Despite the initial difference in pH, the acidification of the cultivation media highlighted the robustness of *L. acidophilus* LA-05 and *L. paracasei* L-10 in fermenting CACE, CCAS, and CGUA. Lactic acid is the main carbohydrate metabolism product in lactic acid bacteria, such as *L. acidophilus* LA-05 and *L. paracasei* L-10, besides being also possible to generate other organic substances during fermentation, which can contribute to producing compounds with beneficial effects on health and capable of altering the sensory characteristics of fermented foods (Ayivi et al., 2020). Acetic acid is also produced by lactic acid bacteria during

carbohydrate fermentation (Patrignani et al., 2017). In turn, citric acid and succinic acid are naturally found in fruits and, consequently, in their coproducts, although some lactic acid bacteria have the ability to produce these organic acids depending on the fermentation medium (Eiteman and Ramalingam, 2015; Ho et al., 2015). In this study, citric and succinic acids were detected in all culture media, with succinic acid being the most prevalent in CCAS regardless of the inoculated *Lactobacillus* strain.

The global metabolic profiling of the different media fermented by *L. acidophilus* LA-05 and *L. paracasei* L-10 evidenced the changes in the available compounds during fermentation, confirming fructose and glucose as the substrates most predominant in the media, as well as the generation of metabolites resulting from their fermentation, such as lactic and acetic acids. This approach is consistent with previous studies that used NMR to analyze the metabolic profile of fermented substrates, providing a comprehensive view of changes in the composition of these substrates during fermentation, as well as the characterization of the produced metabolites (Le et al., 2023; Markkinen et al., 2022; Hatzakis, 2019).

Principal Component Analysis (PCA) enables the exploration of patterns in global metabolic profiling results and the identification of trends in metabolite formation (da Silva et al., 2023; Sampaio et al., 2022). The PCA results showed a clear differentiation between the culture media based on the compounds detected, making it possible to group culture media with similar metabolic profiles. The similarity between CCAS fermented by *L. acidophilus* LA-05 and *L. paracasei* L-10 and CACE fermented by *L. acidophilus* LA-05 shows the influence of the inoculated probiotic on the metabolites produced during fermentation. Likewise, the similarity of metabolic profile between CGUA fermented by *L. acidophilus* LA-05 and *L. paracasei* L-10 and CACE fermented by *L. paracasei* L-10 suggests consistent patterns associated with these specific fermentation systems. These results agree with existing literature regarding the influence of bacterial strains and fermentation conditions on final products (Lee

et al., 2016). The ability to distinguish between different fermentation conditions based on the metabolic profile is important to optimize the production of desired compounds and better understand the metabolic processes of the probiotic lactobacilli used in this study.

The fruit coproducts tested in this study had a varied profile of phenolic compounds, which are biologically active secondary metabolites widely found in fruits (Andrade et al., 2019; Dantas et al., 2023), with recognized antioxidant properties (Kasprzak-Drozdz, 2021; Lima et al 2019; Sampaio et al., 2021). Additionally, phenolic compounds can stimulate adhesion in the intestinal mucosa and protect probiotic cultures from unfavorable conditions, such as the passage through the gastrointestinal tract (dos Santos et al., 2019; de Souza et al., 2019). Recent studies have demonstrated that phenolic compounds can reduce inflammation and improve the metabolic profile by stimulating the multiplication of beneficial bacterial populations and increasing metabolite production in the intestinal environment (Alves et al., 2023; Sampaio et al., 2021; de Souza et al., 2019).

The analysis of phenolic compounds in CACE, CCAS, and CGUA during fermentation highlights the potential of these cultivation media for producing bioactive molecules. Although the majority of the phenolic compounds were detected at the beginning of the fermentation, some phenolic compounds, such as procyanidin A2 (found only after 20 h of fermentation), rutin, isorhamnetin, cis-resveratrol, and procyanidin B2 had increased contents during fermentation in CACE, CCAS, and/or CGUA, indicating a positive impact of the fermentation of these media by *L. acidophilus* LA-05 and *L. paracasei* L-10 on their contents.

In agreement with the increase in the phenolic compound contents, it was also possible to observe that the fermentation of CACE, CCAS, and/or CGUA by *L. acidophilus* LA-05 and *L. paracasei* L-10 resulted in increased antioxidant activity. A previous study also reported that fermentation of acerola and guava coproducts by lactic acid bacteria increased phenolic compounds and antioxidant activity (Oliveira et al., 2020). This behavior could be associated

with the use of dietary fibers by bacteria during fermentation, with consequent breakdown of the plant cellular structure and release of more phenolic compounds bound to the fibrous matrix (de Souza et al., 2019; Oliveira et al., 2020), impacting the antioxidant activity. Furthermore, the presence of procyanidin B2, quercetin-3-glycoside, rutin, and isorhamnetin, as well as the increased antioxidant activity in CACE, CCAS, and CGUA fermented by *L. acidophilus* LA-05 and *L. paracasei* L-10 may confer additional benefits to consumer health, especially if used as an ingredient to the food and/or pharmaceutical industry.

Fibers are divided into two groups, namely soluble (pectins, mucilage, and gums) and insoluble fibers (cellulose, hemicellulose, lignins, and resistant starch) (Oliveira et al., 2022). The tested fruit coproducts had soluble and insoluble fibers, with CACE and CGUA having mostly insoluble fiber and CCAS having mostly soluble fiber. Soluble and insoluble fiber contents increased overall during fermentation, contributing to promoting a more nutritious product. This is particularly relevant considering the growing interest of consumers in functional and healthy food products (de Albuquerque et al., 2019; Oliveira et al., 2022). Fibers can serve as a substrate for metabolization by probiotic bacteria (Lima et al., 2023), as well as for protecting bacterial cells against adverse environments, such as the gastrointestinal tract, or in preservation bioprocesses, such as freeze-drying (Sampaio et al., 2021; da Silva et al., 2023). Previous studies showed that plant matrices can prevent the dehydration of bacterial cell membranes and, consequently, preserve cellular metabolism during drying processes (Araujo et al., 2020; Genevois et al., 2017; Palavecino Prpich, 2023).

CACE, CCAS, and CGUA exerted a protective effect on the survival of *L. acidophilus* LA-05 and *L. paracasei* L-10, preserving the culturability (viable cell count >7 log CFU/mL and high survival rate, $>86\%$) after freeze-drying. These results are important for the large-scale production of these probiotics while maintaining viability. Likewise, greater protection was observed for *L. acidophilus* LA-05 and *L. paracasei* L-10 cultivated and freeze-dried in

CACE, CCAS, and CGUA during 120 days of refrigerated storage. These results indicate the importance of these media in preserving the viability of probiotic strains when freeze-dried and stored for a long period under refrigeration. The presence of compounds with cryoprotective action, such as sugars (glucose and fructose), fibers, and phenolic compounds, in CACE, CCAS, and CGUA may have favored better survival of the bacteria tested (Araujo et al., 2020; Di et al., 2023; Sornsene et al., 2022).

The protective effects of carbohydrates during freeze-drying and subsequent storage of probiotic microorganisms have been reported in previous studies (Chotiko and Sathivel, 2014; Tymczyszyn et al., 2012). Polysaccharides can offer physical protection to probiotic cultures by fixing cells in the insoluble fiber matrix during dehydration processes (Araújo et al., 2020; Genevois et al., 2016). Furthermore, protective agents with antioxidant activity, such as phenolic compounds, can act to minimize reactive oxygen species (Tao et al., 2019).

CACE, CCAS, and CGUA improved the survival of *L. acidophilus* LA-05 and *L. paracasei* L-10 during exposure to simulated gastrointestinal conditions. The resistance to adverse conditions in the gastrointestinal tract is important to ensure that probiotics reach the intestine in high doses to exert their beneficial effects on the host. Variations in pH, the presence of digestive enzymes, high osmolarity, and the presence of bile may account for damage to the cell membrane, DNA, and cellular proteins, leading to a loss of bacterial viability (Amund, 2016; Melchior et al., 2021), and strategies are needed to minimize the exposure of bacterial cells to these adverse conditions and ensure their delivery in high viable counts and functionality in the host organism.

CACE, CCAS, and CGUA limited the damage produced by freeze-drying and simulated gastrointestinal digestion in *L. acidophilus* LA-05 and *L. paracasei* L-10 at 1 and 120 days of refrigerated storage, resulting in higher living cell subpopulation sizes, i.e., intact and metabolically active cells. Several structural and metabolic changes occur in bacterial cells

when exposed to adverse conditions (Lima et al., 2019), such as changes in metabolism, cell integrity, and plasma membrane fluidity (Cui et al., 2018; Lima et al., 2023). These results indicate the ability of culture media made from fruit coproducts to preserve the cellular functionality of probiotics even after freeze-drying and exposure to stressful conditions of the gastrointestinal tract.

5. Conclusion

The results showed that using CACE, CCAS, and CGUA as substrates to cultivate *L. acidophilus* LA-05 and *L. paracasei* L-10 resulted in several benefits. These fruit coproducts effectively stimulated probiotic growth, inducing bioactive metabolite production and increased antioxidant activity during fermentation. CACE, CCAS, and CGUA increased the survival of *L. acidophilus* LA-05 and *L. paracasei* L-10 to freeze-drying and helped to preserve their culturability, membrane integrity, and metabolic activity during prolonged refrigerated storage and exposure to simulated gastrointestinal digestion. Overall, CACE, CCAS, and CGUA not only optimized the growth, viability, and functionality of the tested probiotic strains but also enriched the final products with bioactive compounds, being an innovative and circular strategy for producing high-quality probiotic cultures for the food industry.

References

- Alves, J.L.B., Brasil, J.M.A., Maia, L.A., Lima, M. Costa, Sampaio, K.B., Souza, E.L., 2023. Phenolic compounds in hypertension: Targeting gut-brain interactions and endothelial dysfunction. *J. Funct. Foods* 104, 105531. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2023.105531>
- Amund, O.D., 2016. Exploring the relationship between exposure to technological and gastrointestinal stress and probiotic functional properties of lactobacilli and bifidobacteria. *Can. J. Microbiol.* 62(9), 715-725. <https://doi.org/10.1139/cjm-2016-0186>
- Andrade, M.A., Lima, V., Sanches Silva, A., Vilarinho, F., Castilho, M.C., Khwaldia, K., Ramos, F., 2019. Pomegranate and grape by-products and their active compounds: Are they a valuable source for food applications? *Trends Food Sci. Technol.* 86, 68–84. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2019.02.010>

Angulo-López, J.E., Flores-Gallegos, A.C., Torres León, C., Ramírez-Guzmán, K., Martínez, G.A., Aguilar, C.N., 2021. Guava (*Psidium guajava* L.) fruit and valorization of industrialization by-products. *Processes* 9(6), 1075. <https://doi.org/10.3390/pr9061075>

Araújo, C.M., Sampaio, K.B., Menezes, F.N.D.D., Almeida, E.T.D.C., Lima, M.D.S., Viera, V.B., ... Oliveira, M.E.G., 2020. Protective effects of tropical fruit processing coproducts on probiotic *Lactobacillus* strains during freeze-drying and storage. *Microorganisms* 8, 96. <https://doi.org/10.3390/microorganisms8010096>

AOAC 2019. Official Methods of Analysis. 21st Edn. AOAC International, Arlington. ISBN: 978-0935584899.

Ayivi, R.D., Ibrahim, S.A., Krastanov, A., Somani, A., Siddiqui, S.A., 2022. The impact of alternative nitrogen sources on the growth and viability of *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus*. *J. Dairy Sci.* 105(10), 7986-7997. <https://doi.org/10.3168/jds.2022-21971>

Bagad, M., Pande, R., Dubey, V., Ghosh, A.R., 2017. Survivability of freeze-dried probiotic *Pediococcus pentosaceus* strains GS4, GS17 and *Lactobacillus gasseri* (ATCC 19992) during storage with commonly used pharmaceutical excipients within a period of 120 days. *Asian Pac. J. Trop. Biomed.* 7(10), 921-929. <https://doi.org/10.1016/j.apjtb.2017.09.005>

Bisson, G., Marino, M., Poletti, D., Innocente, N., Maifreni, M., 2021. Turbidimetric definition of growth limits in probiotic *Lactobacillus* strains from the perspective of an adaptation strategy. *J. Dairy Sci.* 104(12), 12236–12248. <https://doi.org/10.3168/jds.2021-20888>

Campos, D.A., Gómez-García, R., Vilas-Boas, A.A., Madureira, A.R., Pintado, M.M., 2020. Management of fruit industrial by-products-A case study on circular economy approach. *Molecules* 25(2), 320. <https://doi.org/10.3390/molecules25020320>

Can-Cauich, C.A., Sauri-duc, E., Betancur-Ancona, D., Chel-Guerrero, L., González-Aguilar, G.A., Cuevas-Glory, L.F., ... Moo-Huchin, V.M., 2017. Tropical fruit peel powders as functional ingredients: Evaluation of their bioactive compounds and antioxidant activity. *J. Funct. Foods* 37, 501–506. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2017.08.028>

Cejas, L., Romano, N., Moretti, A., Mobili, P., Golowczyc, M., Gómez-Zavaglia, A., 2017. Malt sprout, an underused beer by-product with promising potential for the growth and dehydration of lactobacilli strains. *J. Food Sci. Technol.* 54(13), 4464–4472. <https://doi.org/10.1007/s13197-017-2927-7>

Chamorro, F., Carpena, M., Fraga-Corral, M., Echave, J., Riaz Rajoka, M.S., Barba, F.J., ... Simal-Gandara, J., 2022. Valorization of kiwi agricultural waste and industry by-products by recovering bioactive compounds and applications as food additives: A circular economy model. *Food Chem.* 370, 131315. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2021.131315>

Cheng, Z., Yan, X., Wu, J., Weng, P., Wu, Z., 2022. Effects of freeze drying in complex cyoprotectants on the survival, and membrane fatty acid composition of *Lactobacillus plantarum* L1 and *Lactobacillus fermentum* L2. *Cryobiology* 105, 1-9. <https://doi.org/10.1016/j.cryobiol.2022.01.003>

- Chotiko, A., Sathivel, S., 2014. Effects of enzymatically-extracted purple rice bran fiber as a protectant of *L. plantarum* NRRL B-4496 during freezing, freeze drying, and storage. LWT - Food Sci. Technol. 59(1), 59–64. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2014.05.056>
- Coelho, E.M., Padilha, C.V.S., Miskinis, G.A., Sá, A.G.B., Pereira, G.E., Azevedo, L.C., Lima, M.S., 2018. Simultaneous analysis of sugars and organic acids in wine and grape juices by HPLC: Method validation and characterization of products from northeast Brazil. J. Food Compos. Anal. 66, 160–167. <https://doi.org/10.1016/j.jfca.2017.12.017>
- Cui, L., Niu, L., Li, D., Liu, C., Liu, Y., Liu, C., Song, J., 2017. Effects of different drying methods on quality, bacterial viability and storage stability of probiotic enriched apple snacks. J. Integr. Agric. 17(1), 247–255. [https://doi.org/10.1016/S2095-3119\(17\)61742-8](https://doi.org/10.1016/S2095-3119(17)61742-8)
- Dantas, A.M., Fernandes, F.G., Magnani, M., Borges, G.S.C., 2023. Gastrointestinal digestion assays for evaluating the bioaccessibility of phenolic compounds in fruits and their derivatives: an overview. Food Res. Int. 170, 112920. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2023.112920>
- da Silva, J.Y.P., do Nascimento, H.M.A., de Albuquerque, T.M.R., Sampaio, K.B., Lima, M.S., Monteiro, M., ... de Souza, E.L., 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 <https://doi.org/10.1007/s12602-023-10134-x>
- de Assis, B.B.T., Pimentel, T.C., Dantas, A.M., Lima, M.S., Borges, G.S. C., Magnani, M., 2021. Biotransformation of the Brazilian Caatinga fruit-derived phenolics by *Lactobacillus acidophilus* La-5 and *Lacticaseibacillus casei* 01 impacts bioaccessibility and antioxidant activity. Food Res. Int. 146, 110435. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2021.110435>
- de Albuquerque, T.M.R., Garcia, E.F., de Oliveira Araújo, A., Magnani, M., Saarela, M., de Souza, E.L., 2018. *In vitro* characterization of *Lactobacillus* strains isolated from fruit processing by-products as potential probiotics. Probiotics Antimicrob. Proteins 10(4), 704–716. <https://doi.org/10.1007/s12602-017-9318-2>.
- de Albuquerque, M.A.C., Levit, R., Beres, C., Bedani, R., de LeBlanc, A.M., Saad, S.M.I., LeBlanc, J.G., 2019. Tropical fruit by-products water extracts as sources of soluble fibres and phenolic compounds with potential antioxidant, anti-inflammatory, and functional properties. J. Funct. Foods 52, 724–733. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2018.12.002>
- de Sousa Guedes, J.P., de Souza, E.L., 2018. Investigation of damage to *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes* and *Salmonella Enteritidis* exposed to *Mentha arvensis* L. and *M. piperita* L. essential oils in pineapple and mango juice by flow cytometry. Food Microbiol. 76, 564–571. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2017.09.020>
- de Souza, E.L., de Albuquerque, T.M.R., dos Santos, A.S., Massa, N.M.L., de Brito Alves, J.L., 2019. Potential interactions among phenolic compounds and probiotics for mutual boosting of their health-promoting properties and food functionalities—A review. Crit. Rev. Food Sci. Nutr. 59, 1645–1659. <https://doi.org/10.1080/10408398.2018.1425285>

Di, L., Ma, W., Kang, W., Hung, Y., Wu, Z., Yin, B., ... Gu, R., 2023. Synergistic combination of cryoprotectants for high freeze-dried survival rate and viable cell counts of *Streptococcus thermophilus*. Dry. Technol. 41(9), 1444-1453. <https://doi.org/10.1080/07373937.2022.2155971>

dos Santos, A.S., de Albuquerque, T.M.R., de Brito Alves, J.L., de Souza, E.L., 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>

Duarte, F.N.D., Rodrigues, J.B., Costa Lima, M., Lima, M.D.S., Pacheco, M.T.B., Pintado, M.M.E., ... de Souza, E.L., 2017. Potential prebiotic properties of cashew apple (*Anacardium occidentale* L.) agro-industrial byproduct on *Lactobacillus* species. J. Sci. Food Agr. 97, 3712–3719. <https://doi.org/10.1002/jsfa.8232>

Eiteman, M.A., Ramalingam, S., 2015. Microbial production of lactic acid. Biotechnol. Lett. 37(5), 955–972. <https://doi.org/10.1007/s10529-015-1769-5>

Ferreira, I.C., da Silva, V.P., Vilvert, J.C., Souza, F.F., de Freitas, S.T., Lima, M.S., 2021. Brazilian varieties of acerola (*Malpighia emarginata* DC.) produced under tropical semi-arid conditions: Bioactive phenolic compounds, sugars, organic acids, and antioxidant capacity. J. Food Biochem. 45(8), e13829. <https://doi.org/10.1111/jfbc.13829>

Fonseca, F., Pénicaud, C., Tymczyszyn, E.E., Gómez-Zavaglia, A., Passot, S., 2019. Factors influencing the membrane fluidity and the impact on production of lactic acid bacteria starters. Appl. Microbiol. Biot. 103(17), 6867-6883. <https://doi.org/10.1007/s00253-019-10002-1>

Gandhi, A., Shah, N.P., 2015. Effect of salt on cell viability and membrane integrity of *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus casei* and *Bifidobacterium longum* as observed by flow cytometry. Food Microbiol. 49, 197-202. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2015.02.003>

Garcia, E.F., de Oliveira Araújo, A., Luciano, W.A., de Albuquerque, T.M.R., de Oliveira Arcanjo, N.M., Madruga, M.S., ... de Souza, E.L., 2018. The performance of five fruit-derived and freeze-dried potentially probiotic *Lactobacillus* strains in apple, orange, and grape juices. J. Sci. Food Agric. 98(13), 5000–5010. <https://doi.org/10.1002/jsfa.9034>

Genevois, C., Flores, S., de Escalada Pla, M., 2016. Byproduct from pumpkin (*Cucurbita moschata* Duchesne ex poiret) as a substrate and vegetable matrix to contain *Lactobacillus casei*. J. Funct. Foods 23, 210-219. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2016.02.030>

Hatzakis, E., 2019. Nuclear Magnetic Resonance (NMR) Spectroscopy in Food Science: A Comprehensive Review. Compr. Rev. Food Sci. Food Saf. 18(1), 189-220. <https://doi.org/10.1111/1541-4337.12408>

Hill, C., Guarner, F., Reid, G., Gibson, G.R., Merenstein, D.J., Pot, B., ... Sanders, M.E., 2014. Expert consensus document. The International Scientific Association for Probiotics and Prebiotics consensus statement on the scope and appropriate use of the term probiotic. Nature reviews. Gastroenterol. Hepatol. 11(8), 506–514. <https://doi.org/10.1038/nrgastro.2014.66>

Ho, V.T., Zhao, J., Fleet, G., 2015. The effect of lactic acid bacteria on cocoa bean fermentation. *Int. J. Food Microbiol.* 205, 54–67.
<https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2015.03.031>

Horwitz, W., Latimer, J.R., George, W., 2005. *Official Methods of Analysis of the Association of Official Analytical Chemists*. 18th ed. Current Through Revision 3, 2010. Gaithersburg, Maryland: AOAC, 45 (985), 101-102.

Kapoor, S., Gandhi, N., Tyagi, S.K., Kaur, A., Mahajan, B.V.C., 2020. Extraction and characterization of guava seed oil: A novel industrial byproduct. *LWT - Food Sci. Technol.* 132, 109882. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2020.109882>

Kasprzak-Drozd, K., Oniszczyk, T., Stasiak, M., Oniszczyk, A., 2021. Beneficial Effects of Phenolic Compounds on Gut Microbiota and Metabolic Syndrome. *Int. J. Mol. Sci.* 22(7), 3715. <https://doi.org/10.3390/ijms22073715>

Le, Y., Lou, X., Yu, C., Guo, C., He, Y., Lu, Y., Yang, H., 2023. Integrated metabolomics analysis of *Lactobacillus* in fermented milk with fish gelatin hydrolysate in different degrees of hydrolysis. *Food Chem.* 408, 135232. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2022.135232>

Lee, I.C., Caggianiello, G., Van Swam, I.I., Taverne, N., Meijerink, M., Bron, P.A., ... Kleerebezem, M., 2016. Strain-Specific Features of Extracellular Polysaccharides and Their Impact on *Lactobacillus plantarum*-Host Interactions. *App. Environ. Microbiol.* 82(13), 3959-3970. <https://doi.org/10.1128/AEM.00306-16>

Lima, M.C., de Sousa, C.P., Fernandez-Prada, C., Harel, J., Dubreuil, J.D., de Souza, E.L., 2019. A review of the current evidence of fruit phenolic compounds as potential antimicrobials against pathogenic bacteria. *Microb. Pathog.* 130, 259–270.
<https://doi.org/10.1016/j.micpath.2019.03.025>

Lima, M.D.C., do Nascimento, H.M.A., da Silva, J.Y.P., de Brito Alves, J.L., de Souza, E.L., 2023. Evidence for the Beneficial Effects of Brazilian Native Fruits and Their By-Products on Human Intestinal Microbiota and Repercussions on Non-Communicable Chronic Diseases-A Review. *Foods* 12(18), 3491. <https://doi.org/10.3390/foods12183491>

Markkinen, N., Pariyani, R., Jokioja, J., Kortenesniemi, M., Laaksonen, O., Yang, B., 2022. NMR-based metabolomics approach on optimization of malolactic fermentation of sea buckthorn juice with *Lactiplantibacillus plantarum*. *Food Chem.* 366, 130630.
<https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2021.130630>.

Menezes, F.N.D.D., de Melo, F.H.C., Vieira, A.R.S., Almeida, É.T.C., Lima, M.S., Aquino, J.S., ... de Souza, E.L., 2021. Acerola (*Malpighia glabra* L.) and guava (*Psidium guayaba* L.) industrial processing by-products stimulate probiotic *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* growth and induce beneficial changes in colonic microbiota. *J. Appl. Microbiol.* 130(4), 1323–1336. <https://doi.org/10.1111/jam.14824>

Melchior, S., Marino, M., D'Este, F., Innocente, N., Nicoli, M.C., Calligaris, S., 2021. Effect of the formulation and structure of monoglyceride-based gels on the viability of probiotic *Lactobacillus rhamnosus* upon *in vitro* digestion. *Food Funct.* 12(1), 351–361.
<https://doi.org/10.1039/d0fo01788d>

- Mousavi, Z., Mosavi, M., 2019. The effect of fermentation by *Lactobacillus plantarum* on the physicochemical and functional properties of liquorice root extract. *LWT - Food Sci. Technol.* 105, 164-168. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2019.02.003>
- Nascimento, D.S., Sampaio, K.B., Nascimento, Y.M., Souza, T.A., Souza, F.S., Chaves Júnior, J.V., ... Souza, E.L., 2022. Evaluating the stability of a novel nutraceutical formulation combining probiotic *Limosilactobacillus fermentum* 296, quercetin, and resveratrol under different storage conditions. *Probiotics Antimicrob. Proteins*, 1–13. <https://doi.org/10.1007/s12602-022-10011-z>
- Oliveira, S.P.A., do Nascimento, H.M.A., Sampaio, K.B., de Souza, E.L., 2020. A review on bioactive compounds of beet (*Beta vulgaris* L. subsp. *vulgaris*) with special emphasis on their beneficial effects on gut microbiota and gastrointestinal health. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 61, 2022–2033. <https://doi.org/10.1080/10408398.2020.1768510>
- Oliveira, F.L., Arruda, T.Y.P., Morzelle, M.C., Pereira, A.P.A., Casarotti, S.N., 2022. Fruit by-products as potential prebiotics and promising functional ingredients to produce fermented milk. *Food Res. Int.* 161, 111841. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2022.111841>
- Padilha, C.V.S., Miskinis, G.A., de Souza, M.E.A.O., Pereira, G.E., de Oliveira, D., Bordignon-Luiz, M.T., dos Santos Lima, M., 2017. Rapid determination of flavonoids and phenolic acids in grape juices and wines by RP-HPLC/DAD: Method validation and characterization of commercial products of the new Brazilian varieties of grape. *Food Chem.* 228, 106-115. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2017.01.137>
- Palavecino Prpich, N., Sanabria, E., Gliemmo, M.F., Cayré, M.E., Castro, M.P., 2023. Yacon juice as culture and cryoprotectant medium for *Latilactobacillus sakei* and *Staphylococcus vitulinus* autochthonous strains. *Braz. J. Food Technol.* 26, e2022119. <https://doi.org/10.1590/1981-6723.11922>
- Paparella, A., Taccogna, L., Aguzzi, I., Chaves-López, C., Serio, A., Marsilio, F., Suzzi, G., 2008. Flow cytometric assessment of the antimicrobial activity of essential oils against *Listeria monocytogenes*. *Food Control* 19(12), 1174–1182. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2008.01.002>
- Patrignani, F., Modesto, M., Michelini, S., Sansosti, M.C., Serrazanetti, D.I. Qvirist, L., ... Lanciotti, R., 2017. Technological potential of *Bifidobacterium aesculapii* strains for fermented soymilk production. *LWT - Food Sci. Technol.* 89, 689-696. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2017.11.048>
- Paula, D.G.C., Vasconcelos, C.M., Pereira, A.F., Quintão, A.L.C., Chaves, J., Parreiras, P., Menezes, C.C., 2022. Maceration time over antioxidant activity, volatile compounds and temporal dominant sensation of fermented jabuticaba. *Food Sci. Technol.* 42, e43221. <https://doi.org/10.1590/fst.43221>
- Quintana, G., Gerbino, E., Gómez-Zavaglia, A., 2017. Okara: A nutritionally valuable by-product able to stabilize *Lactobacillus plantarum* during freeze-drying, spray-drying and storage. *Front. Microbiol.* 8, 641. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.00641>

Reddy, G.V.S., Vijaya, Ch., Ramesh, B., Kameswaran, S., Silpa, S., Chandra, M.S., ... Srinivasulu, M., 2021. Organic Waste: A Cheaper Source for Probiotics Production. In: Maddela, N.R., García, L.C. (eds) *Innovations in Biotechnology for a Sustainable Future*. Springer, Cham. https://doi.org/10.1007/978-3-030-80108-3_6

Romano, N., Schebor, C., Mobili, P., Gómez-Zavaglia, A., 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>

Ruiz Rodríguez, L.G., Zamora Gasga, V.M., Pescuma, M., Van Nieuwenhove, C., Mozzi, F., Sánchez Burgos, J.A., 2021. 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 Res. Int.* 140, 109854. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2020.109854>

Sá, N.M.S.M., Mattos, A.L.A., Silva, L.M.A., Brito, E.S., Rosa, M.F., Azeredo, H.M.C., 2020. From cashew byproducts to biodegradable active materials: Bacterial cellulose-lignin-cellulose nanocrystal nanocomposite films. *Int. J. Biol. Macromol.* 161, 1337–1345. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2020.07.269>

Salminen, S., Collado, M.C., Endo, A., Hill, C., Lebeer, S., Quigley, E.M.M., ... Vinderola, G., 2021. The International Scientific Association of Probiotics and Prebiotics (ISAPP) consensus statement on the definition and scope of postbiotics. *Nat. Rev. Gastroenterol. Hepatol.* 18(9), 649–667. <https://doi.org/10.1038/s41575-021-00440-6>

Sayago-Ayerdi, S., García-Martínez, D.L., Ramírez-Castillo, A.C., Ramírez-Concepción, H. R., Viuda-Martos, M., 2021. Tropical Fruits and Their Co-Products as Bioactive Compounds and Their Health Effects: A Review. *Foods* 10(8), 1952. <https://doi.org/10.3390/foods10081952>

Sampaio, K.B., do Nascimento, Y.M., Tavares, J.F., Cavalcanti, M.T., de Brito Alves, J.L., Garcia, E.F., de Souza, E.L., 2021. Development and in vitro evaluation of novel nutraceutical formulations composed of *Limosilactobacillus fermentum*, quercetin and/or resveratrol. *Food Chem.* 342, 128264. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2020.128264>

Sampaio, K.B., Alves, J.L.B., Nascimento, Y.M., Tavares, J.F., Silva, M.S., Nascimento, D.S., ... de Souza, E.L., 2022. 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.* 161, 111800. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2022.111800>

Śliżewska, K., Chlebicz-Wójcik, A., 2020. Growth kinetics of probiotic *Lactobacillus* strains in the alternative, cost-efficient semi-solid fermentation medium. *Biology* 9(12), 423. <https://doi.org/10.3390/biology9120423>

Sornsenee, P., Chimplee, S., Saengsuwan, P., Romyasamit, C., 2022. Characterization of probiotic properties and development of banana powder enriched with freeze-

dried *Lactobacillus paracasei* probiotics. Heliyon 8(10), e11063.
<https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2022.e11063>

Sträuber, H., Müller, S., 2010. Viability states of bacteria--specific mechanisms of selected probes. Cytom., : j. Int. Soc. Anal. Cytol. 77(7), 623–634.
<https://doi.org/10.1002/cyto.a.20920>

Tao, T., Ding, Z., Hou, D., Prakash, S., Zhao, Y., Fan, Z., ... Han, J., 2019. Influence of polysaccharide as co-encapsulant on powder characteristics, survival and viability of microencapsulated *Lactobacillus paracasei* Lpc-37 by spray drying. J. Food Eng. 252, 10–17.
<https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2019.02.009>

Tymczyszyn, E.E., Sosa, N., Gerbino, E., Hugo, A., Gómez-Zavaglia, A., Schebor, C., 2012. Effect of physical properties on the stability of *Lactobacillus bulgaricus* in a freeze-dried galacto-oligosaccharides matrix. Int. J. Food Microbiol. 155(3), 217–221.
<https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2012.02.008>

Figure captions

Figure 1. Growth kinetics (average $\pm$ standard deviation, n: 3) of *Lactobacillus acidophilus* LA-05 (A, C) and *Lacticaseibacillus paracasei* L-10 (B, D) in MRS broth (control [□]) and in medium with acerola (*Malpighia glabra* L. [▲]), cashew (*Anacardium occidentale* L. [■]), guava (*Psidium guajava* L. [●]) processing coproducts during 24 h of fermentation.

Figure 2. Principal component analysis (PCA) of acerola (*Malpighia glabra* L.), cashew (*Anacardium occidentale* L.), and guava (*Psidium guajava* L.) processing coproducts based on binning integrals of ^1H NMR spectra. (A) – Score plot; (B) – Loadings plot

Figure 3. Hierarchical cluster analysis (HCA) of acerola (*Malpighia glabra* L.), cashew (*Anacardium occidentale* L.), and guava (*Psidium guajava* L.) processing coproducts based on binning integrals of ^1H NMR spectra.

Figure 4. Viable cell counts (log CFU/g, average $\pm$ standard deviation, n: 3) of *Lactobacillus acidophilus* LA-05 (A) and *Lacticaseibacillus paracasei* L-10 (B) after freeze-drying in medium with acerola (*Malpighia glabra* L., CACE [▲]), cashew (*Anacardium occidentale* L., CCAS [■]), and guava (*Psidium guajava* L., CGUA [●]) processing coproducts, and in the control medium (de Mann, Rogosa, and Sharpe broth) [□], during 120 days of refrigerated storage (4 ± 1 °C).

Figure 5. Viable cell counts (log CFU/g, average $\pm$ standard deviation, n: 3) of freeze-dried *Lactobacillus acidophilus* LA-05 (A; B) and *Lacticaseibacillus paracasei* L-10 (C; D) in medium with acerola (*Malpighia glabra* L., CACE [▲]), cashew (*Anacardium occidentale* L., CCAS [■]), and guava (*Psidium guajava* L., CGUA [●]) processing coproducts, and in the control medium (de Mann, Rogosa, and Sharpe broth) [□], during simulated gastrointestinal digestion at day 1 (A; C) and 120 (B; D) of refrigerated storage (4 ± 1 °C).

Figure 6. Size of cell subpopulations (% , average $\pm$ standard deviation, n: 3) of freeze-dried *Lactobacillus acidophilus* LA-05 (A; B) and *Lacticaseibacillus paracasei* L-10 (C; D) in medium with acerola (*Malpighia glabra* L., CACE), cashew (*Anacardium occidentale* L., CCAS), and guava (*Psidium guajava* L., CGUA) processing coproducts, and in the control medium (de Mann, Rogosa, and Sharpe broth) during simulated gastrointestinal digestion at day 1 (A; C) and 120 (B; D) of refrigerated storage (4 ± 1 °C). F: after freeze-drying; M: mouth; phase; G: gastric phase; I: intestinal phase.

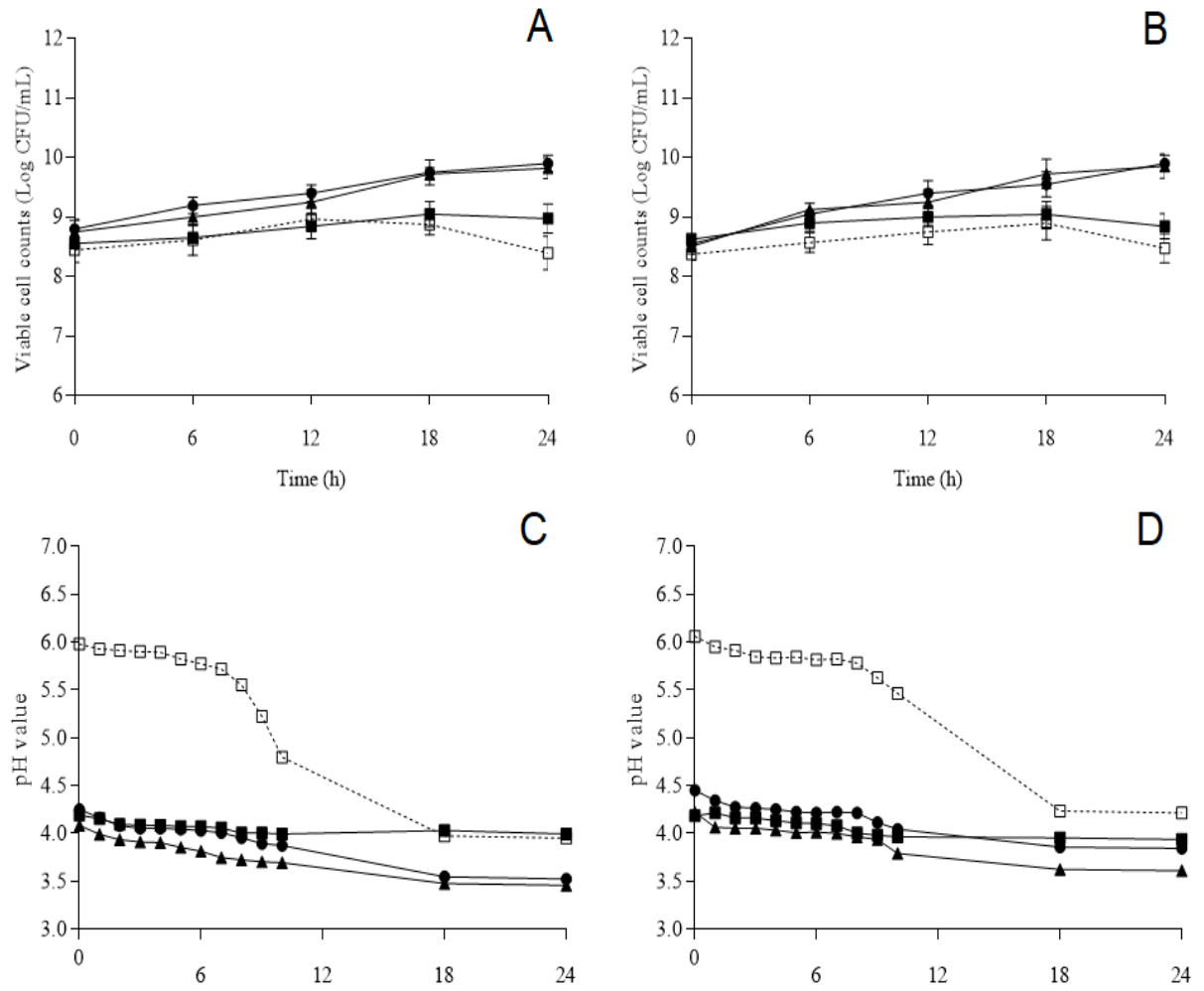


Fig. 1.

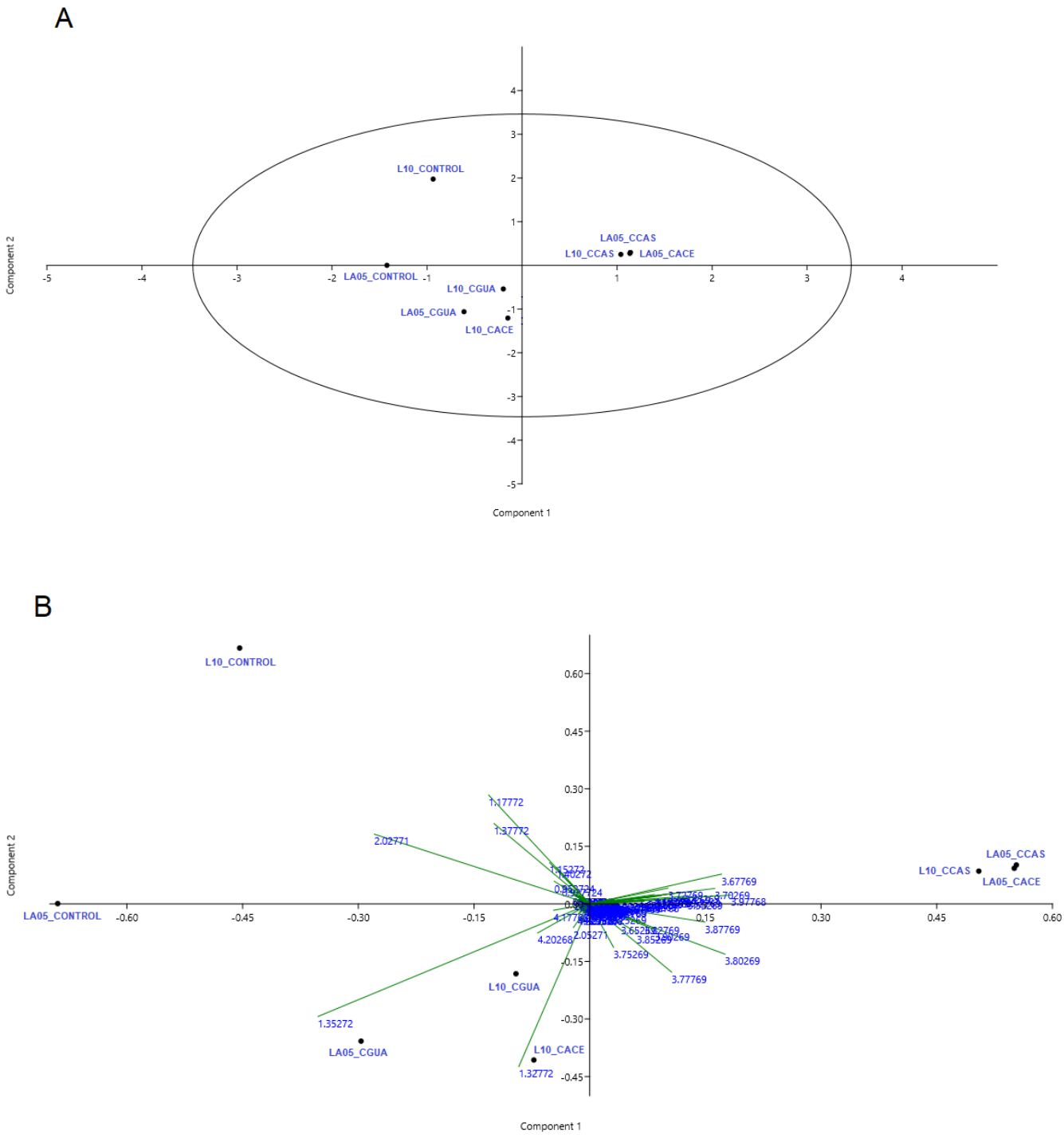
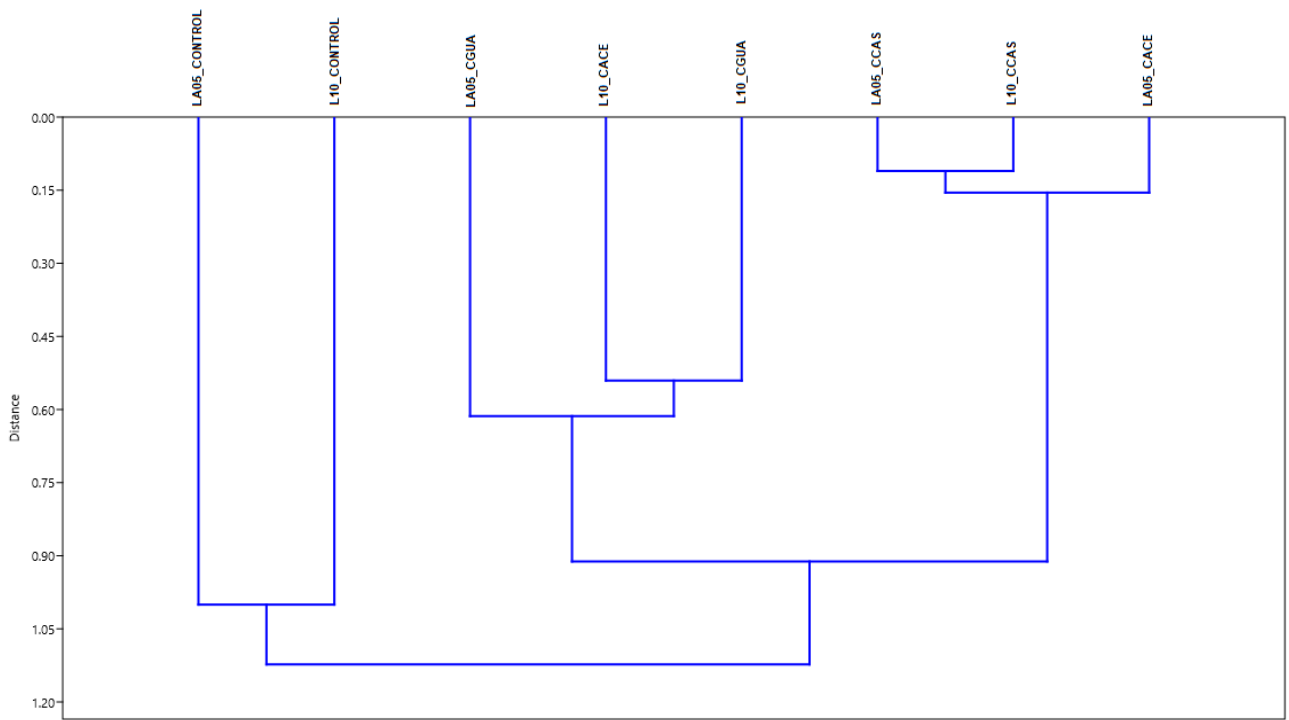


Fig. 2.

**Fig. 3.**

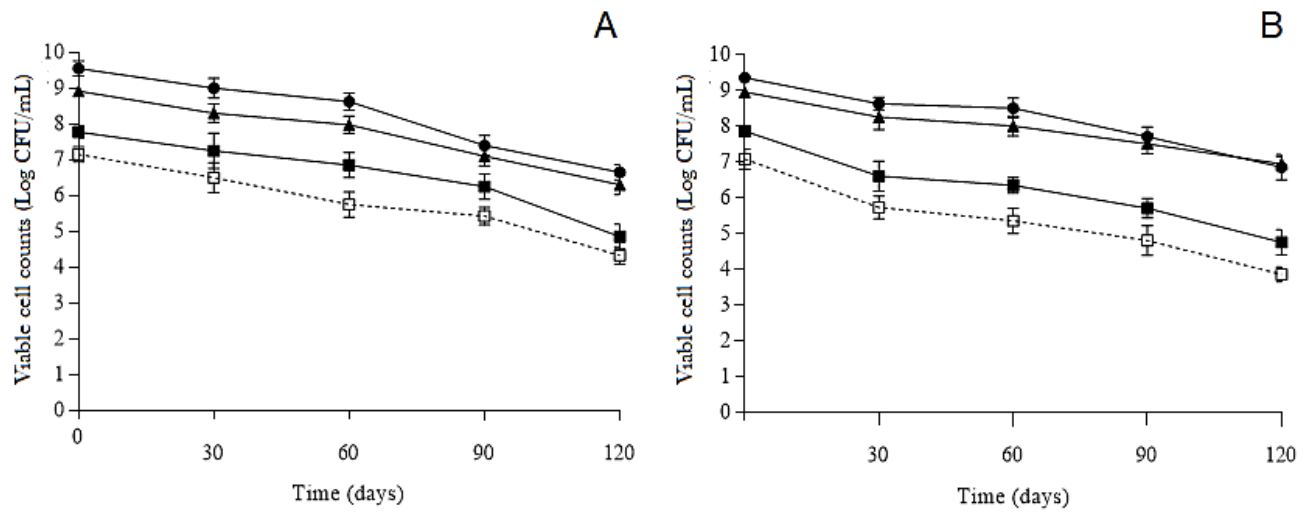


Fig. 4

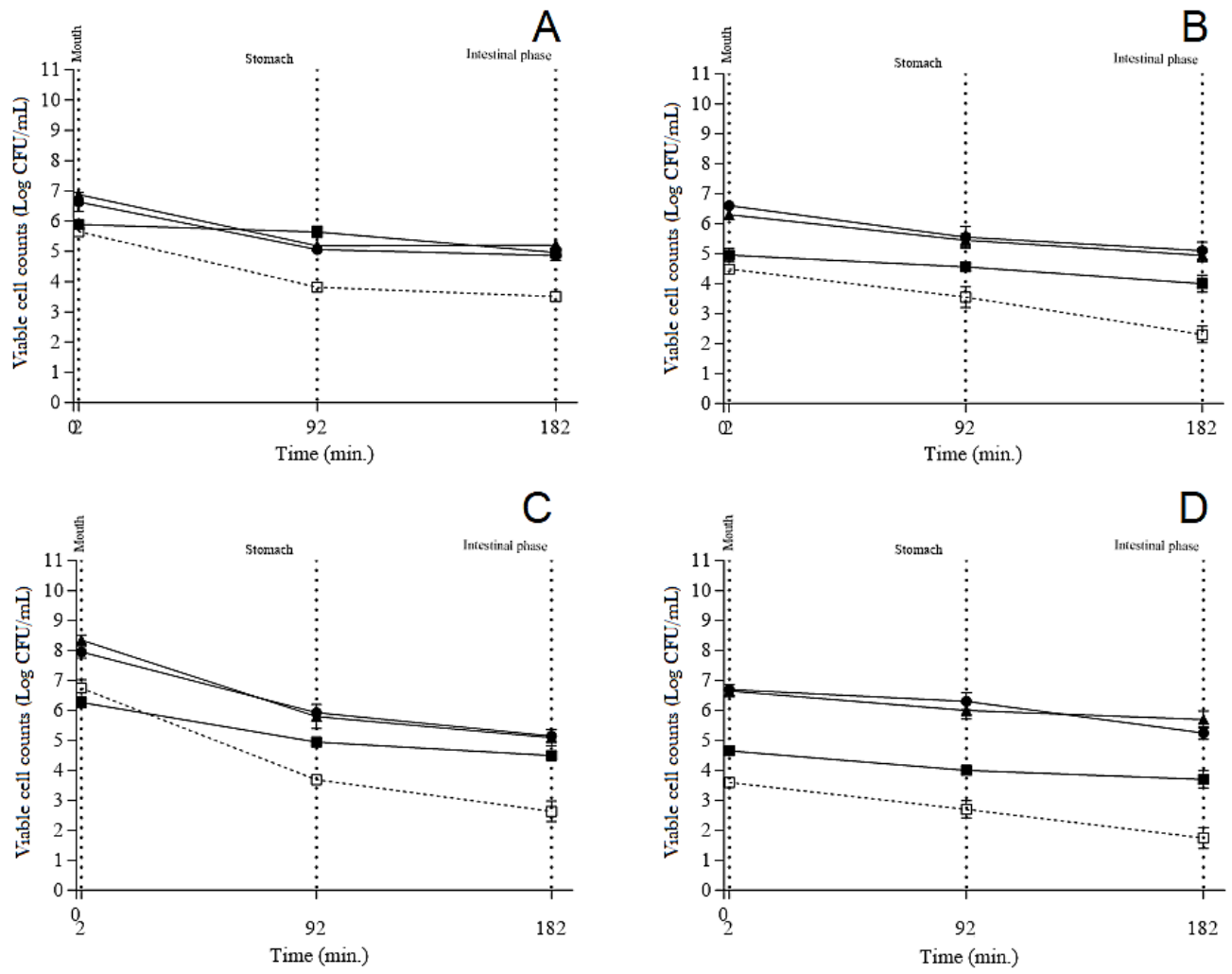


Fig. 5.

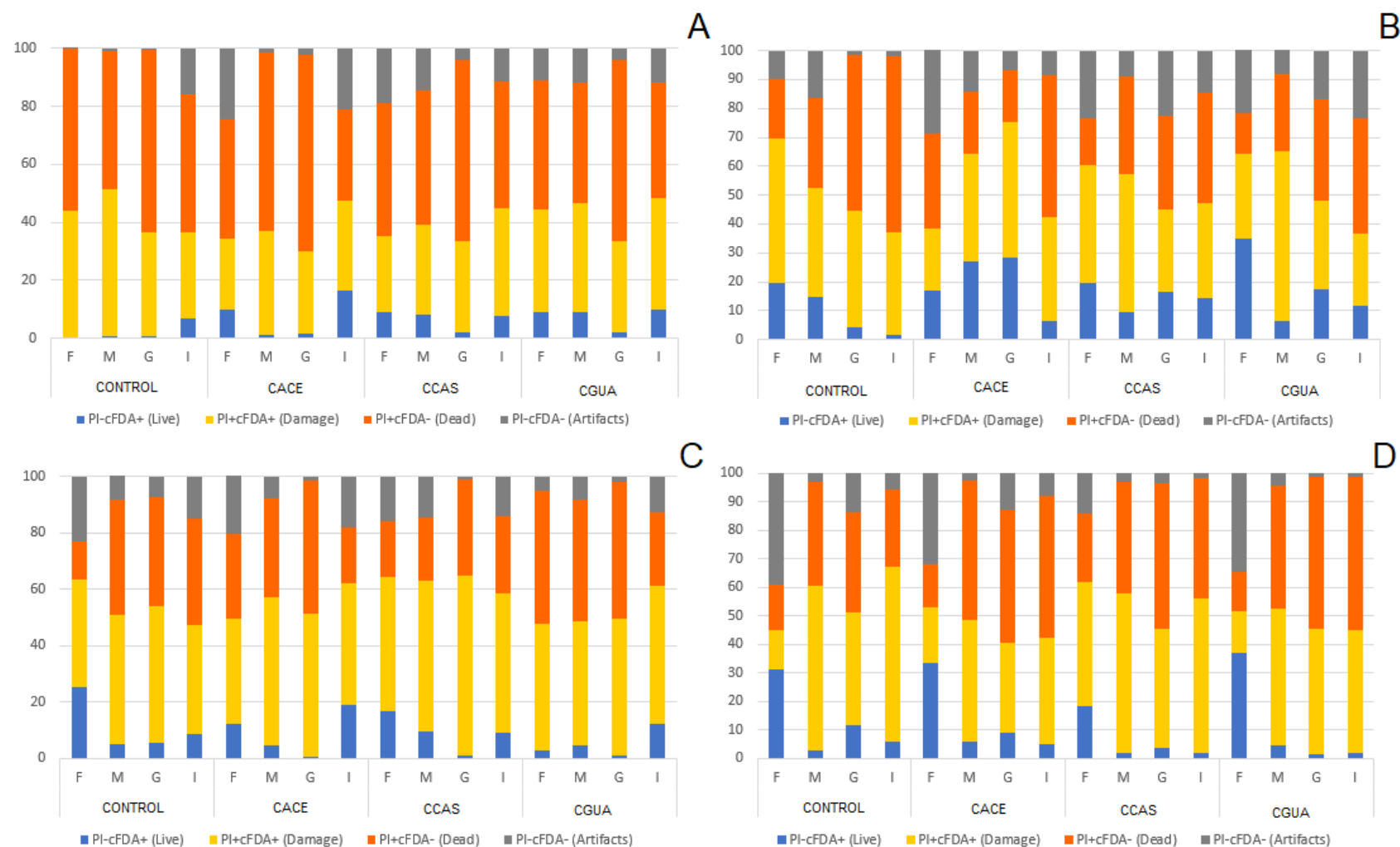


Fig. 6

Table 1. Gross composition and water activity (average $\pm$ standard deviation, $n = 3$) of freeze-dried acerola (*Malpighia glabra* L., CACE), cashew (*Anacardium occidentale* L., CCAS), and guava (*Psidium guajava* L., CGUA) coproducts.

Centesimal composition	Acerola	Cashew	Guava
a_w ¹	0.31 ± 0.01^a	0.19 ± 0.00^b	0.34 ± 0.00^a
Moisture (g/100 g)	8.63 ± 0.18^b	9.59 ± 0.20^a	7.56 ± 0.17^c
Ash (g/100 g)	1.71 ± 0.04^a	1.54 ± 0.04^b	1.64 ± 0.01^{ab}
Protein (g/100 g)	8.48 ± 0.11^b	6.62 ± 0.04^c	9.26 ± 0.10^a
Lipids (g/100 g)	5.21 ± 0.14^b	3.88 ± 0.10^c	13.19 ± 0.29^a

¹ a_w : water activity.

^{a-c}: Different letters on the same row denote differences ($p < 0.05$) among fruit coproducts, based on Tukey's test.

Table 2. Growth kinetics parameters (average $\pm$ standard deviation, n: 3) of *Lactobacillus acidophilus* LA-05 and *Lacticaseibacillus paracasei* L-10 in medium with coproducts of acerola (*Malpighia glabra* L., CACE), the cashew apple (*Anacardium occidentale* L., CCAS), guava (*Psidium guajava* L., CGUA), or control (de Man, Rogosa and Sharpe broth, MRS).

<i>Lactobacillus acidophilus</i> LA-05				
	Lag time (h)	Medium acidification rate (pH units/h)	pH (final)	R ²
Control	4.27	0.11	3.95	0.985
CACE	1.36	0.03	3.46	0.998
CCAS	6.20	0.01	3.99	0.993
CGUA	1.22	0.03	3.53	0.998
<i>Lacticaseibacillus paracasei</i> L-10				
	Lag time (h)	Medium acidification rate (pH units/h)	pH (final)	R ²
Control	2.44	0.10	4.22	0.987
CACE	1.11	0.02	3.61	0.997
CCAS	7.30	0.01	3.94	0.989
CGUA	2.10	0.03	3.85	0.999

Table 3. Sugars and acids contents (g/L, average ± standard deviation, n: 3) in medium with coproducts of acerola (*Malpighia glabra* L., CACE), cashew (*Anacardium occidentale* L., CCAS), guava (*Psidium guajava* L., CGUA), or control (de Man, Rogosa and Sharpe broth, MRS) at zero, 12 and 20 h of fermentation. 119

Parameters	<i>Lactobacillus acidophilus</i> LA-05				<i>Lactocaseibacillus paracasei</i> L-10		
	Samples	Incubation times (h)			Incubation times (h)		
		0 h	12 h	20 h	0 h	12 h	20 h
Sugars (g/L)							
Glucose	Control	22.23 ± 0.90 ^{Aa}	12.95 ± 0.15 ^{Ba}	0.49 ± 0.05 ^{Cb}	18.67 ± 0.03 ^{Aa}	13.27 ± 0.03 ^{Ba}	2.31 ± 0.07 ^{Cb}
	CACE	4.37 ± 0.11 ^{Ac}	4.04 ± 0.03 ^{Bc}	0.29 ± 0.02 ^{Cc}	4.83 ± 0.04 ^{Ac}	4.26 ± 0.08 ^{Bc}	1.77 ± 0.12 ^{Cc}
	CCAS	9.17 ± 0.09 ^{Ab}	8.34 ± 0.16 ^{Bb}	4.22 ± 0.01 ^{Ba}	9.13 ± 0.04 ^{Ab}	5.52 ± 0.09 ^{Bb}	3.79 ± 0.06 ^{Ca}
	CGUA	3.90 ± 0.04 ^{Ad}	3.04 ± 0.01 ^{Bd}	0.47 ± 0.07 ^{Cb}	2.75 ± 0.08 ^{Ad}	2.06 ± 0.06 ^{Bd}	0.64 ± 0.06 ^{Cd}
Fructose	Control	0.64 ± 0.02 ^{Ad}	0.32 ± 0.04 ^{Bd}	<LOD	0.49 ± 0.09 ^{Ad}	0.51 ± 0.06 ^{Ad}	0.08 ± 0.02 ^{Bd}
	CACE	6.79 ± 0.08 ^{Ab}	6.41 ± 0.08 ^{Bb}	3.16 ± 0.06 ^{Cc}	7.73 ± 0.01 ^{Ab}	7.41 ± 0.03 ^{Bb}	3.79 ± 0.06 ^{Cb}
	CCAS	10.19 ± 0.05 ^{Aa}	9.55 ± 0.12 ^{Ba}	9.15 ± 0.06 ^{Ca}	9.23 ± 0.01 ^{Aa}	9.22 ± 0.07 ^{Aa}	8.38 ± 0.04 ^{Ba}
	CGUA	6.53 ± 0.10 ^{Ac}	5.89 ± 0.06 ^{Bc}	3.72 ± 0.08 ^{Cb}	5.30 ± 0.06 ^{Ac}	4.93 ± 0.09 ^{Bc}	3.25 ± 0.05 ^{Cc}
Maltose	Control	0.66 ± 0.03 ^{Aa}	0.35 ± 0.06 ^{Ba}	<LOD	0.48 ± 0.08 ^{Aa}	0.47 ± 0.05 ^{Aa}	<LOD
	CACE	0.58 ± 0.04 ^{Ab}	0.11 ± 0.02 ^{Bc}	<LOD	0.12 ± 0.01 ^{Bd}	0.16 ± 0.02 ^{Ac}	0.18 ± 0.04 ^{Aa}
	CCAS	0.30 ± 0.03 ^{Ac}	0.32 ± 0.06 ^{Aa}	0.36 ± 0.01 ^{Aa}	0.36 ± 0.01 ^{Ab}	0.32 ± 0.01 ^{Bb}	0.24 ± 0.05 ^{Ca}
	CGUA	0.25 ± 0.01 ^{Ad}	0.18 ± 0.01 ^{Bb}	<LOD	0.20 ± 0.01 ^{Ac}	0.12 ± 0.01 ^{Bd}	<LOD
Acids (g/L)							
Citric acid	Control	1.44 ± 0.08 ^{Aa}	0.97 ± 0.03 ^{Ba}	0.50 ± 0.04 ^{Ca}	1.24 ± 0.01 ^{Ab}	1.11 ± 0.10 ^{Ba}	0.55 ± 0.01 ^{Ca}
	CACE	1.31 ± 0.04 ^{Ab}	0.79 ± 0.08 ^{Bb}	0.08 ± 0.01 ^{Cb}	1.38 ± 0.08 ^{Aa}	1.23 ± 0.09 ^{Aa}	0.23 ± 0.01 ^{Bc}
	CCAS	0.14 ± 0.01 ^{Ac}	0.06 ± 0.01 ^{Bc}	0.04 ± 0.01 ^{Bc}	0.42 ± 0.04 ^{Ad}	0.34 ± 0.01 ^{Bb}	0.32 ± 0.01 ^{Bb}
	CGUA	1.33 ± 0.03 ^{Ab}	0.78 ± 0.03 ^{Bb}	0.47 ± 0.08 ^{Ca}	1.09 ± 0.01 ^{Bc}	1.14 ± 0.03 ^{Aa}	0.14 ± 0.02 ^{Cd}
Latic acid	Control	1.04 ± 0.04 ^{Ba}	0.84 ± 0.09 ^{Ca}	17.95 ± 0.55 ^{Aa}	0.69 ± 0.05 ^{Ba}	0.66 ± 0.06 ^{Ba}	9.55 ± 0.04 ^{Aa}
	CACE	0.67 ± 0.04 ^{Bb}	0.71 ± 0.02 ^{Bb}	3.68 ± 0.04 ^{Ac}	0.46 ± 0.01 ^{Bc}	0.40 ± 0.04 ^{Cc}	2.77 ± 0.02 ^{Ab}
	CCAS	0.69 ± 0.11 ^{Ab}	0.65 ± 0.01 ^{Ac}	0.59 ± 0.04 ^{Ad}	0.68 ± 0.01 ^{Aa}	0.56 ± 0.01 ^{Bb}	0.45 ± 0.04 ^{Cd}
	CGUA	0.66 ± 0.05 ^{Cb}	0.85 ± 0.04 ^{Ba}	3.84 ± 0.09 ^{Ab}	0.53 ± 0.01 ^{Bb}	0.37 ± 0.04 ^{Cc}	2.30 ± 0.01 ^{Ac}
Acetic acid	Control	4.24 ± 0.12 ^{Ba}	2.60 ± 0.08 ^{Ca}	4.68 ± 0.13 ^{Aa}	2.82 ± 0.08 ^{Ca}	3.08 ± 0.10 ^{Ba}	3.55 ± 0.01 ^{Aa}
	CACE	0.20 ± 0.03 ^{Cb}	0.31 ± 0.01 ^{Bb}	1.50 ± 0.15 ^{Ab}	0.16 ± 0.03 ^{Bb}	0.18 ± 0.04 ^{Bb}	0.94 ± 0.07 ^{Ac}
	CCAS	0.35 ± 0.14 ^{Ab}	0.14 ± 0.01 ^{Bc}	0.18 ± 0.06 ^{Bd}	0.23 ± 0.08 ^{Bb}	0.13 ± 0.01 ^{Cb}	0.40 ± 0.01 ^{Ad}
	CGUA	0.15 ± 0.06 ^{Cb}	0.30 ± 0.03 ^{Bb}	1.25 ± 0.01 ^{Ac}	0.16 ± 0.01 ^{Bb}	0.12 ± 0.02 ^{Cb}	1.08 ± 0.04 ^{Ab}
Succinic acid	Control	<LOD	0.37 ± 0.04 ^{Bd}	0.44 ± 0.08 ^{Ac}	<LOD	<LOD	0.50 ± 0.08 ^{Ad}
	CACE	1.94 ± 0.02 ^{Ac}	2.08 ± 0.04 ^{Ac}	2.05 ± 0.09 ^{Ab}	2.22 ± 0.03 ^{Ab}	1.94 ± 0.07 ^{Cc}	2.11 ± 0.03 ^{Bc}
	CCAS	7.37 ± 0.08 ^{Ba}	8.73 ± 0.09 ^{Aa}	8.73 ± 0.07 ^{Aa}	8.84 ± 0.02 ^{Aa}	8.40 ± 0.03 ^{Ca}	8.45 ± 0.01 ^{Ba}
	CGUA	2.41 ± 0.08 ^{Ab}	2.26 ± 0.01 ^{Bb}	2.09 ± 0.04 ^{Cb}	2.03 ± 0.01 ^{Cc}	2.14 ± 0.01 ^{Bb}	2.28 ± 0.02 ^{Ab}

A–C: Different superscript capital letters in the same row denote differences ($p < 0.05$) between fermentation times, based on Student’s t-test or Tukey’s test; a–d: Different superscript small letters in the same column, for the same time interval and measured parameter, denote difference ($p < 0.05$), based on Student’s t-test or Tukey’s test. <LOD: below the limit of detection (fructose and maltose: 0.02 g/L; lactic acid, citric acid and succinic acid: 0.03g/L; acetic acid: 0.01 g/L).

Table 4. Fiber contents (% , average $\pm$ standard deviation, n: 3) in medium with coproduct of acerola (*Malpighia glabra* L., CACE), cashew (*Anacardium occidentale* L., CCAS), or guava (*Psidium guajava* L., CGUA) at zero and 20 h of fermentation.

Fiber contents (g/100 g)	Samples	Incubation times (h)		<i>Lactobacillus acidophilus</i> LA-05	<i>Lacticaseibacillus paracasei</i> L-10
		0 h	20 h	20 h	20 h
Insoluble fiber	CACE	2.90 $\pm$ 0.20 ^{Ca}	3.35 $\pm$ 0.22 ^{Bb}		4.35 $\pm$ 0.15 ^{Aa}
	CCAS	1.45 $\pm$ 0.13 ^{Cb}	2.25 $\pm$ 0.10 ^{Bc}		2.80 $\pm$ 0.12 ^{Ab}
	CGUA	2.70 $\pm$ 0.19 ^{Ba}	4.30 $\pm$ 0.12 ^{Aa}		4.40 $\pm$ 0.15 ^{Aa}
Soluble fiber	CACE	0.95 $\pm$ 0.18 ^{Bb}	1.20 $\pm$ 0.18 ^{Bc}		1.55 $\pm$ 0.10 ^{Aa}
	CCAS	1.70 $\pm$ 0.10 ^{Ba}	2.65 $\pm$ 0.25 ^{Aa}		1.65 $\pm$ 0.15 ^{Ba}
	CGUA	1.55 $\pm$ 0.28 ^{Aa}	1.65 $\pm$ 0.08 ^{Ab}		1.80 $\pm$ 0.20 ^{Aa}
Total fiber	CACE	3.85 $\pm$ 0.20 ^{Cb}	4.55 $\pm$ 0.20 ^{Bb}		5.90 $\pm$ 0.13 ^{Aa}
	CCAS	3.15 $\pm$ 0.15 ^{Cc}	4.90 $\pm$ 0.23 ^{Ab}		4.45 $\pm$ 0.16 ^{Bb}
	CGUA	4.25 $\pm$ 0.20 ^{Ba}	6.05 $\pm$ 0.10 ^{Aa}		6.20 $\pm$ 0.18 ^{Aa}

A-C: Different superscript capital letters in the same row denote differences ($p < 0.05$), based on Tukey's test; a-c: Different superscript small letters in the same column, for the same time interval and measured parameter, denote difference ($p < 0.05$), based on Tukey's test.

Table 5. Phenolic compounds contents (g/L, average $\pm$ standard deviation, n: 3) in medium with coproduct of acerola (*Malpighia glabra* L., CACE), cashew (*Anacardium occidentale* L., CCAS), or guava (*Psidium guajava* L., CGUA) at zero and 20 h of fermentation.

Phenolic compounds (mg/L)	Samples	<i>Lactobacillus acidophilus</i> LA-05 <i>Lactobacillus paracasei</i> L10			
		Incubation times (h)		Incubation times (h)	
		0 h	20 h	0 h	20 h
Hesperidin	CACE	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD
	CCAS	3.42 $\pm$ 0.21 ^{Aa}	3.02 $\pm$ 0.26 ^{Aa}	3.35 $\pm$ 0.28 ^{Aa}	3.03 $\pm$ 0.47 ^{Aa}
	CGUA	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD
Cis-resveratrol	CACE	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD
	CCAS	2.89 $\pm$ 0.05 ^{Ba}	7.52 $\pm$ 0.69 ^{Aa}	2.92 $\pm$ 0.09 ^{Ba}	7.19 $\pm$ 0.09 ^{Aa}
	CGUA	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD
Procyanidin B1	CACE	5.30 $\pm$ 0.18 ^{Bb}	3.80 $\pm$ 0.86 ^{Cb}	6.76 $\pm$ 0.45 ^{Aa}	3.98 $\pm$ 0.82 ^{Ca}
	CCAS	<LOD	3.10 $\pm$ 0.8 ^{Bb}	<LOD	4.24 $\pm$ 0.3 ^{Aa}
	CGUA	6.45 $\pm$ 0.07 ^{Aa}	5.77 $\pm$ 0.15 ^{Ba}	6.38 $\pm$ 0.43 ^{Aa}	3.98 $\pm$ 0.09 ^{Ca}
Catechin	CACE	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD
	CCAS	4.70 $\pm$ 0.43 ^B	5.39 $\pm$ 0.16 ^{Aa}	5.47 $\pm$ 0.20 ^A	5.21 $\pm$ 0.05 ^{Aa}
	CGUA	<LOD	4.66 $\pm$ 0.1 ^{Ab}	<LOD	4.21 $\pm$ 0.1 ^{Bb}
Procyanidin B2	CACE	6.63 $\pm$ 0.08 ^{Cb}	6.88 $\pm$ 0.13 ^{Bc}	7.53 $\pm$ 0.30 ^{Ab}	6.23 $\pm$ 0.12 ^{Dc}
	CCAS	5.16 $\pm$ 0.08 ^{Bc}	7.18 $\pm$ 0.14 ^{Ab}	4.96 $\pm$ 0.14 ^{Bc}	7.14 $\pm$ 0.05 ^{Aa}
	CGUA	8.02 $\pm$ 0.02 ^{Aa}	7.88 $\pm$ 0.26 ^{Aa}	8.35 $\pm$ 0.36 ^{Aa}	6.90 $\pm$ 0.12 ^{Bb}
Procyanidin A2	CACE	<LOD	7.21 $\pm$ 0.07 ^{Bc}	<LOD	7.74 $\pm$ 0.12 ^{Ab}
	CCAS	<LOD	8.55 $\pm$ 0.18 ^{Ab}	<LOD	8.24 $\pm$ 0.07 ^{Ba}
	CGUA	<LOD	9.80 $\pm$ 0.22 ^{Aa}	<LOD	7.44 $\pm$ 0.26 ^{Bb}
Trans-resveratrol	CACE	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD
	CCAS	6.82 $\pm$ 0.09 ^A	5.69 $\pm$ 0.28 ^B	6.16 $\pm$ 0.53 ^B	5.96 $\pm$ 0.53 ^B
	CGUA	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD
Myricetin	CACE	1.38 $\pm$ 0.23 ^{Bb}	<LOD	2.33 $\pm$ 0.18 ^{Ab}	<LOD
	CCAS	8.48 $\pm$ 0.16 ^{Ba}	8.28 $\pm$ 0.27 ^{Ba}	8.34 $\pm$ 0.16 ^{Ba}	9.05 $\pm$ 0.19 ^{Aa}
	CGUA	1.64 $\pm$ 0.09 ^{Bb}	1.46 $\pm$ 0.29 ^{Bb}	2.01 $\pm$ 0.10 ^{Ac}	1.84 $\pm$ 0.15 ^{Ab}
Quercetin 3-glucoside	CACE	2.78 $\pm$ 0.12 ^{Bb}	2.41 $\pm$ 0.18 ^{Cb}	3.04 $\pm$ 0.11 ^{Ab}	2.49 $\pm$ 0.02 ^{Cb}
	CCAS	1.96 $\pm$ 0.38 ^{Bc}	1.83 $\pm$ 0.24 ^{Bc}	2.09 $\pm$ 0.20 ^{Bc}	3.29 $\pm$ 0.62 ^{Aa}
	CGUA	3.10 $\pm$ 0.01 ^{Aa}	3.26 $\pm$ 0.38 ^{Aa}	3.36 $\pm$ 0.17 ^{Aa}	2.41 $\pm$ 0.36 ^{Ba}
Rutin	CACE	1.22 $\pm$ 0.28 ^{Da}	6.13 $\pm$ 0.08 ^{Bb}	2.04 $\pm$ 0.04 ^{Ca}	6.65 $\pm$ 0.18 ^{Ab}
	CCAS	1.08 $\pm$ 0.05 ^{Ca}	9.02 $\pm$ 0.03 ^{Ba}	1.36 $\pm$ 0.25 ^{Cb}	9.72 $\pm$ 0.07 ^{Aa}
	CGUA	1.38 $\pm$ 0.01 ^{Aa}	1.28 $\pm$ 0.08 ^{Bc}	1.54 $\pm$ 0.09 ^{Ab}	1.46 $\pm$ 0.29 ^{Ac}
Isorhamnetin	CACE	1.24 $\pm$ 0.05 ^{Cc}	9.39 $\pm$ 0.56 ^{Aa}	1.30 $\pm$ 0.09 ^{Cc}	8.60 $\pm$ 0.07 ^{Ba}
	CCAS	5.88 $\pm$ 0.18 ^{Aa}	5.41 $\pm$ 0.74 ^{Ab}	6.03 $\pm$ 0.22 ^{Aa}	4.55 $\pm$ 0.05 ^{Bb}
	CGUA	1.52 $\pm$ 0.04 ^{Ab}	1.36 $\pm$ 0.05 ^{Bc}	1.68 $\pm$ 0.13 ^{Ab}	1.10 $\pm$ 0.18 ^{Cc}

A–D: Different superscript capital letters in the same row denote differences ($p < 0.05$), based on Student's t-test or Tukey's test; a–c: Different superscript small letters in the same column, for the same time interval and measured parameter, denote difference ($p < 0.05$), based on Student's t-test or Tukey's test. <LOD: below the limit of detection.

Table 6. Activity antioxidant in medium with coproduct of acerola (*Malpighia glabra* L., CACE), cashew (*Anacardium occidentale* L., CCAS), guava (*Psidium guajava* L., CGUA), or control (De Man, Rogosa e Sharpe broth, MRS) at zero and 20 h of fermentation.

Activity antioxidant	Samples	<i>Lactobacillus acidophilus</i> LA-05 <i>Lactocaseibacillus paracasei</i> L-10 Incubation times (h)		
		0 h	20 h	20 h
FRAP (μmol FeSO ₄ /g)	Control	4.50 ± 0.20 ^{Ad}	4.20 ± 0.25 ^{Ad}	3.50 ± 0.52 ^{Ad}
	CACE	64.60 ± 0.31 ^{Ca}	106.10 ± 0.32 ^{Ba}	157.40 ± 0.60 ^{Aa}
	CCAS	24.10 ± 0.15 ^{Cb}	44.20 ± 0.20 ^{Ab}	29,50 ± 0.06 ^{Bb}
	CGUA	8.00 ± 0.18 ^{Cc}	36.50 ± 0.15 ^{Ac}	11.40 ± 0.13 ^{Bc}
ABTS (μmol TEAC/g) ¹	Control	2.75 ± 0.25 ^{Cd}	8.53 ± 0.10 ^{Bd}	11.50 ± 0.21 ^{Ad}
	CACE	17.71 ± 0.40 ^{Cb}	50.65 ± 0.23 ^{Bc}	72.34 ± 0.42 ^{Aa}
	CCAS	11.21 ± 0.21 ^{Cc}	56.20 ± 0.14 ^{Ab}	35.21 ± 0.35 ^{Bb}
	CGUA	22.89 ± 0.12 ^{Ca}	57.73 ± 0.25 ^{Aa}	28.85 ± 0.16 ^{Bc}
DPPH (μmol TEAC/g) ¹	Control	3.54 ± 0.41 ^{Ab}	4.45 ± 0.52 ^{Ad}	4.33 ± 0.10 ^{Ad}
	CACE	4.69 ± 0.30 ^{Ba}	10.03 ± 0.44 ^{Aa}	10.45 ± 0.24 ^{Aa}
	CCAS	3.95 ± 0.23 ^{Cb}	6.29 ± 0.10 ^{Ab}	5.39 ± 0.18 ^{Bc}
	CGUA	3.80 ± 0.16 ^{Cb}	5.83 ± 0.2 ^{Bc}	9.51 ± 0.14 ^{Ab}

A-C: Different superscript capital letters in the same row denote differences ($p < 0.05$), based on Tukey's test; a-d: Different superscript small letters in the same column, for the same time interval and measured parameter, denote difference ($p < 0.05$), based on Tukey's test.

¹The results are expressed as micromoles of Trolox equivalent antioxidant capacity (TEAC) per gram of sample (μmol TEAC/g). Abbreviations: FRAP, ferric reducing ability of plasma. ABTS^{•+}, cation - 2,2-azino-bis (3-ethylbenzo-tiazoline)-6-sulfonic acid. DPPH[•], cation - 2,2- diphenyl-1-picrylhydrazyl.

Table 7. Viable cell counts (log CFU/mL, average $\pm$ standard deviation, n: 3) of *Lactobacillus acidophilus* LA-05 and *Lacticaseibacillus paracasei* L-10 before and after freeze-drying in medium with coproduct of acerola (*Malpighia glabra* L., CACE), cashew (*Anacardium occidentale* L., CCAS), guava (*Psidium guajava* L., CGUA), or control (De Man, Rogosa e Sharpe broth, MRS).

Growing medium	<i>Lactobacillus acidophilus</i> LA-05			
	Before freeze-drying	After freeze-drying	Average log reduction	Survival rate %
Control	9.00 $\pm$ 0.14 ^{Ab}	7.13 $\pm$ 0.20 ^{Bd}	1.86 $\pm$ 0.06 ^a	79.26 $\pm$ 1.03 ^d
CACE	9.85 $\pm$ 0.07 ^{Aa}	8.92 $\pm$ 0.05 ^{Bb}	0.93 $\pm$ 0.01 ^c	90.55 $\pm$ 0.07 ^b
CCAS	8.94 $\pm$ 0.08 ^{Ab}	7.77 $\pm$ 0.16 ^{Bc}	1.17 $\pm$ 0.08 ^b	86.90 $\pm$ 1.07 ^c
CGUA	9.75 $\pm$ 0.07 ^{Aa}	9.45 $\pm$ 0.07 ^{Ba}	0.29 $\pm$ 0.00 ^d	96.97 $\pm$ 0.09 ^a
	<i>Lacticaseibacillus paracasei</i> L-10			
	Before freeze-drying	After freeze-drying	Average log reduction	Survival rate %
Control	8.76 $\pm$ 0.12 ^{Ab}	7.08 $\pm$ 0.28 ^{Bd}	1.68 $\pm$ 0.16 ^a	80.76 $\pm$ 2.11 ^d
CACE	9.82 $\pm$ 0.10 ^{Aa}	8.86 $\pm$ 0.02 ^{Bb}	0.96 $\pm$ 0.08 ^b	90.23 $\pm$ 0.75 ^b
CCAS	9.01 $\pm$ 0.15 ^{Ab}	7.86 $\pm$ 0.04 ^{Bc}	1.15 $\pm$ 0.11 ^b	87.24 $\pm$ 1.03 ^c
CGUA	9.75 $\pm$ 0.06 ^{Aa}	9.35 $\pm$ 0.07 ^{Ba}	0.45 $\pm$ 0.01 ^c	95.84 $\pm$ 0.09 ^a

A-B: Different superscript capital letters in the same row denote differences ($p < 0.05$), based on Student's t-test; a-d: Different superscript small letters in the same column denote difference ($p < 0.05$) between cultivation media, based on Tukey's test.

APÊNDICE C – ARTIGO II

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

Abstract: This study evaluated the effects of acerola and guava fruit processing by-products fermented with probiotic *Lactobacillus acidophilus* LA-05 and *Lacticaseibacillus paracasei* L-10 on the abundance of different intestinal bacterial groups and microbial metabolic activity during 48 h of *in vitro* fecal fermentation. Digested fermented fruit by-products increased the relative abundance of beneficial bacterial groups while overall decreasing or maintaining the relative abundance of not beneficial bacterial groups, indicating putatively selective stimulatory effects on beneficial bacterial intestinal populations. The by-products stimulated microbial metabolic activity due to the decrease in pH, sugar consumption, short-chain fatty acid production, phenolic compound and metabolic profile alteration, and high antioxidant capacity during fecal fermentation. The results suggest that fermented fruit by-products could induce beneficial changes in the relative abundance of several bacterial groups, as well as in the metabolic activity of the human intestinal microbiota, being novel and circular candidates for use as synbiotic ingredients.

Keywords: fruit waste; probiotic; prebiotic; gut microbiota; functional ingredient; metabolism.

1. Introduction

Fruits and fruit-derived food products have attracted greater consumer interest in the last decades due to their nutritional contents and bioactive components associated with several health-promoting properties [1]. Brazil is considered one of the world's largest tropical fruit

producers. Acerola (*Malpighia emarginata* D.C.) and guava (*Psidium guajava* L.) are among the most popular tropical fruits cultivated in Brazil, being recognized for their high acceptance, nutritional value, variety of bioactive compounds, and reported beneficial effects on consumer health [2, 3].

Most of the acerola and guava production is destined for processing to produce juices, frozen pulp, sweets, and jellies, with the generation of high quantities of agro-industrial by-products [4, 5]. The reuse of these by-products represents a relevant strategy for the circular economy linked to the agro-food sector, prolonging the life cycle, reducing waste, and making wise use of the available resources [6]. Acerola and guava by-products consist mainly of peels, seeds, and remaining part of the pulp, representing a natural source of several bioactive compounds, including ascorbic acid, phenolic compounds, carotenoids, and dietary fiber, that could be exploited as functional ingredients for the food and pharmaceutical industry due to their well-known antioxidant and/or potential prebiotic properties [7-10].

Prebiotics are recognized as compounds that resist gastric acidity, not being hydrolyzed by the upper part of the gastrointestinal tract, reaching the colon to be fermented by the beneficial intestinal microbiota, including probiotics, providing beneficial effects to health, such as improving digestive system function and immunological response [11, 12]. Furthermore, phenolic compounds found in fruit by-products are metabolized by the colonic microbiota and exert different physiological effects, including a local effect in modulating the intestinal microbiota [5, 13, 14].

Studies on the effects of fruit by-products fermented by probiotics on the intestinal microbiota are still scarce. Few studies have evaluated *in vitro* the potential prebiotic properties of fruit by-products, reporting stimulatory effects on the growth and metabolism of probiotic *Lactobacillus* and *Bifidobacterium*, in addition to increasing the production of short-chain fatty acids [15, 16]. *Lactobacillus* spp. is typically added to commercial probiotic and fermented

products due to its reported health benefits and safe human use [17]. *Lactobacillus acidophilus* and *Lacticaseibacillus paracasei* (previously referred to as *Lactobacillus paracasei*) are among the *Lactobacillus* species most widely used as probiotics and linked to improvements in intestinal microbiota [18], in addition to having satisfactory fermentative abilities [19, 20].

The *Lactobacillus* genus is commonly used as starters and co-starters in producing fermented products with good survival in low pH products during fermentation and refrigeration storage [21]. The fermentation of acerola and guava by-products with probiotic lactobacilli was previously shown as an effective strategy to improve their physicochemical characteristics, bioactive compound profile, and antioxidant properties [22]. Several factors have been linked to the emergence of fruit-based fermented products as carriers of probiotics, such as lactose intolerance, sensitivity to milk protein, and adoption of specific diet patterns (e.g., vegan, paleo, and flexitarian) [23]. The combination of potentially prebiotic fruit by-products and probiotic strains could represent an advantage in producing novel symbiotic products, which could be more effective than either probiotics or prebiotics alone to affect beneficially the intestinal microbiota and induce physiological outcomes [20, 24].

This study hypothesized that the fermentation of acerola and guava by-products with probiotics could produce novel symbiotic ingredients with beneficial effects on human intestinal microbiota. To test this hypothesis, this study performed a submerged fermentation of acerola and guava by-products with probiotic *L. acidophilus* and *L. paracasei* strains and evaluated the effects of the obtained fermented products on the abundance of different bacterial populations and metabolic activity of human intestinal microbiota during an *in vitro* fecal fermentation with a pooled human fecal inoculum.

2. Materials and Methods

2.1 Preparation of fruit processing by-products

The by-products (peel, seeds, and pomace) of acerola (*Malpighia emarginata* D.C.) and guava (*Psidium guayaba* L.) were obtained from a fruit pulp processing industry (João Pessoa, PB, Brazil). The samples were collected from four fruit pulp processing batches, totaling approximately 4 kg for each fruit. Each type of fruit by-product was separately packaged in plastic bags, frozen at -18 °C for 24 h, and then freeze-dried (-55 °C, vacuum pressure of <138 µHg, freeze-drying rate of <1 mm/h, approximately 12 h) using a benchtop freeze dryer (model LI-101; LIOTOP®, São Carlos, Brazil). The freeze-dried material was grounded using a domestic blender (low speed for 10 min) and sieved through a fine mesh to obtain a powder with an average particle size of <1.0 mm. The powdered product was stored at -18 ± 2 °C in hermetically sealed polypropylene bags. The physicochemical characteristics of acerola and guava processing by-products were reported in previous studies [4, 22], highlighting the high contents of soluble and insoluble fiber, strong antioxidant capacity, and presence of a wide variety of phenolic compounds, as summarized in Table S1 (Supplementary material data).

Freeze-dried fruit by-products were individually suspended in distilled water (5% w/v), homogenized using an Ultra Turrax T25 (IKA, Staufen im Breisgau, Germany), and autoclaved (1,5 atm, 15 min, 121°C).

2.2 Microorganisms and fermentation conditions

Two well-known probiotic strains, *Lactobacillus acidophilus* LA-05 and *Lacticaseibacillus paracasei* L-10 [25-27] were used in this study. Stock cultures were maintained in de Man, Rogosa, and Sharpe (MRS; HiMedia, Mumbai, India) broth containing glycerol (150 g/L) at -20 °C. For inoculum preparation, the strains were anaerobically cultured (Anaerogen System Anaerogen, Oxoid) in MRS broth at 37 °C for 24 h. The resulting culture was inoculated (1%, v/v) in fresh MRS broth and incubated under the same conditions until reaching the stationary growth phase (20 – 24 h) [4]. These suspensions had viable cell counts

of approximately 10 log CFU/mL [with optical density (OD) reading at 625 nm (OD_{625}) corresponding to 1.5]. The probiotic suspensions were inoculated individually in 100 mL of acerola or guava by-product suspension with an inoculum concentration of 2% (v/v), followed by incubation at 37 °C for 20 h with agitation (200 rpm). The samples with 20 h of fermentation were selected considering the results of preliminary experiments showing that the highest viable cell counts (*i.e.*, approximately 9 log CFU/mL) of the tested probiotics in acerola and guava by-products suspensions were reached at this fermentation time (late exponential growth phase), being followed by a decline in viable cell counts over time.

2.3 Freeze-drying of fermented fruit by-products

Aliquots (10 mL) of fermented acerola or guava suspensions were neutralized with NaOH to pH 7, transferred aseptically to glass vials, frozen at – 18 °C for 24 h, and freeze-dried for 40 h (-55 ± 2 °C; vacuum pressure <138 µHg, freeze-drying speed of 1 mm/h) using a bench-top freeze-dryer (model L-101, Liotop) [28]. The fermented acerola and guava by-products had probiotic viable cell counts of >9 log CFU/mL when inoculated in MRS agar (HiMedia) at 37 ± 0.5 °C for 24 h. The freeze-dried fermented acerola and guava by-products were stored in desiccators with silica gel (4 ± 0.5 °C) [29]. Four distinct freeze-dried fermented suspensions were produced: i) acerola co-product/s + *L. paracasei* L-10, named AL10; ii) acerola co-product/s + *L. acidophilus* LA-05, named ALA5; iii) guava co-product/s + *L. paracasei* L-10, named GL10; and iv) guava co-product/s + *L. acidophilus* LA-05, named GLA5. The different freeze-dried fermented suspensions were tested separately in the experiments.

2.4 Simulated gastrointestinal digestion of the fermented co-product/s suspensions

AL10, ALA5, GL10, and GLA5 were exposed to simulated gastrointestinal digestion following previously described procedures [30]. Initially, 10 g of each AL10, ALA5, GL10, and GLA5 were rehydrated (15 min) with sterile distilled water (50 mL, 25 ± 0.5 °C), and simulations were carried out continuously in glass flasks (250 mL) mimicking oral, gastric, and intestinal conditions using an incubator (37 ± 0.5 °C) and mechanical agitation to simulate the peristaltic movements, α -amylase (100 U/mL) diluted in 1 mM CaCl_2 and pH adjusted to 6.9 with 1 M NaHCO_3 (exposure time 2 min, 37 ± 0.5 °C, 200 rpm) to simulate the mouth conditions, and pH adjusted to 2.0 with 1 M HCl to simulate the stomach conditions. A pepsin solution (25 mg/mL) in 0.1 M HCl (proportion 0.05 mL/mL of the sample, exposure time 120 min, 37 ± 0.5 °C, 130 rpm) simulated the gastric juice. pH adjusted to 6.0 with 1 M NaHCO_3 simulated the intestinal conditions and two g/L of pancreatin and 12 g/L of bile salts diluted in 1 M NaHCO_3 (proportion 0.25 mL/mL of the sample, exposure time 120 min, 37 ± 0.5 °C, 45 rpm) simulated the intestinal juice.

The suspensions containing the final digestion phase were dialyzed against 0.01 mol/L NaCl (18 h, 5 ± 0.5 °C) with a regenerated cellulose dialysis tubing (1 kDa nominal molecular weight cut-off, Spectra/Por 6, Spectrum Europe BV, Breda, Netherlands). The dialyzed material was frozen (-18 °C), freeze-dried, and stored (5 ± 0.5 °C) in hermetically sealed polyethylene bags for a maximum period of one week [31]. The cellulose dialysis tubing, enzymes, bile salts, and reagents were purchased from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA).

2.5 *Preparation of human fecal inoculum and in vitro fecal fermentation*

An Ethical Committee on Research with Human Beings approved the procedures used in this study (Federal University of Paraíba, Joao Pessoa, PB, Brazil; protocol number 6.080.926) that followed the guidelines of the National Health Council (Resolution 466, 2012). Six healthy adult volunteers (three men and three women, ages 28 to 33) donated feces for the

study and reported eating an omnivorous diet, not suffering from any gastrointestinal or colonic illness, not using concentrated probiotics or prebiotics, and not using antibiotics or other controlled medications for at least 6 months before feces collection [30-33].

Fecal samples were obtained using sterile tubes placed in an anaerobic container (AnaeroGen), pooled (1:1:1:1:1:1 w/w), homogenized with sterile phosphate-buffered saline (PBS; 0.1 M; pH 7.4; 1:10, w/v, 200 rpm, 2 min), and filtered using sterile triple-layer gauze to remove larger particles [32]. The fecal fermentation system was made using separated sterile tubes (50 mL working volume) contained 20% of digested and freeze-dried AL10, ALA5, GL10, and GLA5 (w/v), 40% of pooled fecal inoculum, and 40% sterile (autoclavation, 121 °C, 1 atm, 15 min) fermentation medium (v/v) [composition: 4.5 g NaCl, 4.5 g KCl, 1.5 g NaHCO₃, 0.69 g MgSO₄, 0.8 g L-cysteine, 0.5 g KH₂PO₄, 0.5 g K₂HPO₄, 0.4 g bile salt, 0.08 g CaCl₂, 0.005 g FeSO₄, 1 mL Tween 80, 4 mL resazurin solution (0.25 g/L, as an anaerobic indicator), 1 L of distilled water]. Each tube was placed inside an anaerobic jar equipped with an anaerobiosis generator system (AnaeroGen, Oxoid, Basingstoke, England) and incubated for 48 h at 37 ± 0.5 °C to promote fermentation. A fecal fermentation system containing the well-known prebiotic fructooligosaccharides [FOS (not-digested); 20%, w/v] and with no substrate added were included in the experiment as a positive and negative control, respectively [32-34]. Ingredients to prepare the fermentation media were purchased from Sigma-Aldrich.

2.5.1 Enumeration of the intestinal bacterial populations during *in vitro* fecal fermentation

The capacity of AL10, ALA5, GL10, and GLA5 to affect the relative abundance of several human intestinal bacterial populations was assessed using fluorescent *in situ* hybridization combined with flow cytometry. The fluorescent dye Cy3 (Sigma-Aldrich) was used to identify six different probes: Lab 158 to enumerate *Lactobacillus* spp./*Enterococcus* spp., Bif 164 to enumerate *Bifidobacterium* spp., Rfla 729 to enumerate *Ruminococcus albus*/R.

flavefaciens, Bac 303 to enumerate *Bacteroides* spp./*Prevotella* spp., Chis 150 to enumerate *Clostridium histolyticum*, and Erec 482 to enumerate *Eubacterium rectale*/*Clostridium coccoides*. SYBR Green staining (Molecular Probes, Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) was used to enumerate the total bacterial population [15, 16, 32, 33].

Aliquots (375 µL) from each medium were taken at time zero (immediately following homogenization of the components of the fermentation medium), 24, and 48 h of fermentation, fixed overnight (4% paraformaldehyde), and hybridized with the fluorescent probes using previously described procedures [35, 36]. The different bacterial populations were enumerated using a flow cytometer (BD Accuri C6, BD Biosciences, East Rutherford, NJ, USA). The BD Accuri C6 Software captured signals from individual cells (logarithmic signals) by passing through the laser zone, and fluorescence signals were recorded as cytograms on FL1 (SYBR Green) and FL2 (Lab 158, Bif 164, Rfla 729, Bac 303, Chis 150, and Erec 482). The results were expressed as the relative abundance (percentage) of cells hybridized with each probe concerning the total bacterial population [15, 16, 33, 35].

2.5.2 Determination of microbial metabolism during *in vitro* fecal fermentation

Measurements of pH values and metabolic profiling at time zero, 24, and 48 h of *in vitro* fecal fermentation were used to assess the intestinal microbiota metabolic activity in media with AL10, ALA5, GL10, GLA5, and FOS (positive control), as well as in NC. The pH values (method 981.12) were determined with a digital potentiometer (Quimis, Diadema, SP, Brazil) [37]. Contents of sugars (glucose, fructose, maltose, and rhamnose), lactic, and short-chain fatty acids (SCFA) (acetic, propionic, and butyric acids), and phenolic compounds were determined with high-performance liquid chromatography using a liquid chromatograph (model 1260 Infinity LC, Agilent Technologies, St. Clara, CA, USA) and previously described analytical conditions [38, 39]. The OpenLAB CDS ChemStation Edition software (Agilent Technologies)

processed the data. HPLC sample peaks were identified by comparing their retention times with sugar and organic acid standards (Sigma Aldrich). Average peak areas were considered to quantify sugars and organic acids [34, 38].

The global metabolic profile of the fermentation media was analyzed using Nuclear Magnetic Resonance (NMR). An aliquot (2 mL) of each fermentation medium was diluted in a solution (2 mL) with methanol and deuterated water (9:1, v/v), filtered, and the resulting solution (550 μ L) was placed in a tube (5 mm diameter) for NMR analysis. NMR experiments were performed with a Bruker Avance Neo 500 instrument (500 MHz for ^1H NMR and 125 MHz for ^{13}C NMR; Bruker, Billerica, MA, USA). The parameters to obtain the spectrum sequence were: lc1pngpf2, temperature 26 °C, number of scans 64, Dummer scan 4, receiver gain 32, and acquisition time 3.27 s. The Bruker TopSpin 4.1.1 software processed the spectra [30, 33].

2.5.3 Determination of the antioxidant capacity during in vitro fecal fermentation

The antioxidant capacity in media with AL10, ALA5, GL10, and GLA5 was measured with DPPH $^{\bullet}$ (2,2- diphenyl-1-picrylhydrazyl), FRAP (ferric reducing antioxidant power), and ABTS (2,2'-azino-bis (3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) methods at time zero, 24, and 48 h of fecal fermentation. Initially, two g of media with AL10, ALA5, GL10, and GLA5 were homogenized separately with 10 mL of 80% methanol (Sigma-Aldrich), kept resting for 24 h under room temperature, and filtered (125 mm filter, Whatman). The determination of the antioxidant capacity using DPPH $^{\bullet}$ radical was performed as previously described [39]. Aliquots (50 μ L) of the samples were reacted with DPPH solution in methanol (250 μ L), shaken vigorously, and kept (30 min) in the dark. Measurements of DPPH scavenging activity were performed at a wavelength of 517 nm. Controls were prepared with water to replace a sample. For the “blank”, only the extracting solution (300 μ L) was used. The antioxidant capacity was

calculated using a 2 mM Trolox standard curve (10-2000 μM) and the inhibition percentages were determined using the equation [40]:

$$\text{DPPH radical scavenging capacity (\%)} = \frac{[(\text{ABScontrol} - \text{ABSsample})]/(\text{ABScontrol})}{\times 100} \quad (\text{Eq. 1})$$

The ABScontrol was the absorbance of the DPPH radical + water, and the ABS sample was the absorbance of the DPPH radical + tested sample. The results were expressed in Trolox μmol equivalent per gram of sample ($\mu\text{mol/g}$).

The determination of the antioxidant capacity using ABTS^{•+} radical was performed as previously described [39]. The ABTS radical cation (ABTS^{•+}) was generated with the reaction of 5 mL of aqueous ABTS solution (7 mM) + 88 μL of potassium persulfate solution (140 mM). The mixture was kept in the dark (16 h, 28 ± 0.5 °C) before use and diluted with ethanol to achieve an absorbance of 0.7 ± 0.02 units at 734 nm using a UV–VIS spectrophotometer. Aliquots (50 μL) of the samples were allowed to react with 250 μL of the resulting blue-green ABTS radical solution in the dark. Decreases of absorbance at 734 nm were measured after 6 min. Controls were prepared with water to replace a sample. For the “blank”, only the extracting solution (300 μL) was used. The antioxidant capacity was calculated using a 2 mM Trolox standard curve (10-2000 μM), and the inhibition percentages were determined with the equation [41]:

$$\text{ABTS radical scavenging capacity (\%)} = \frac{[(\text{ABScontrol} - \text{ABSsample})]/(\text{ABScontrol})}{\times 100} \quad (\text{Eq. 2})$$

The ABScontrol was the absorbance of the ABTS radical + water, and ABSsample was the absorbance of the ABTS radical + tested sample. The results were expressed in Trolox μmol equivalent per gram of sample ($\mu\text{mol/g}$).

The antioxidant capacity determined as FRAP was measured according to a previously described procedure [33]. Acetate buffer (0.3 M, pH 3.6), 2,4,6-Tris(2-pyridyl)-s-triazine (TPTZ) solution (10 mM), and ferric chloride solution (20 mM) were combined to create the FRAP reagent in a ratio of 100:10:10. Aliquots of the extracts in the amount of 20 μ L were mixed with 30 μ L of distilled water and 250 μ L of the reagent. After 30 min at 37 °C, the mixture absorbance was measured at 595 nm. The "blank" solution was the FRAP reagent itself. The standard curve was built using solutions with known ferrous sulfate concentrations (50–2000 μ M). The results were expressed in μ mol of ferrous sulfate equivalents per g of sample (μ mol FeSO₄/g).

2.6 Statistical analysis

The experiments were performed in triplicate in three independent repetitions, and the results were expressed as average $\pm$ standard deviation. Kolmogorov-Smirnov normality test determined the normal distribution of the data. Data were submitted to Student's t-test or analysis of variance (one-way ANOVA) followed by Tukey's test. A p-value of ≤ 0.05 was considered statistically significant. The relationship between samples and tested parameters was determined using principal component analysis (PCA). The Pearson correlation coefficient (R) and p-value were calculated to show the correlations in a heat map. A p-value of ≤ 0.05 was considered statistically significant. GraphPad Prism 7.0 software (GraphPad Software, La Jolla, CA, USA) and R software (Version 2.15.3, Ross Ihaka & Robert Gentleman, University of Auckland, Auckland, New Zealand) were used to run the statistical analysis.

3. Results

3.1 Changes in relative abundance of intestinal bacterial populations during *in vitro* fecal fermentation

Differences in the relative abundance of the measured intestinal bacterial populations varied with the examined fermentation medium and fecal fermentation period (Table 1). The relative abundance of *Lactobacillus* spp./*Enterococcus* spp. increased ($p \leq 0.05$) in the different media during the 48 h of fermentation. The highest ($p \leq 0.05$) relative abundances of *Lactobacillus* spp./*Enterococcus* spp. at 24 h of fermentation were found in media with ALA5 ($7.0 \pm 0.36\%$) and GLA5 ($6.93 \pm 0.31\%$). However, the relative abundance of *Lactobacillus* spp./*Enterococcus* spp. at 48 h of fermentation had a two to three-fold increase ($p \leq 0.05$) in media with FOS ($12.18 \pm 0.39\%$), GL10 ($7.90 \pm 0.28\%$), GLA5 ($6.40 \pm 0.42\%$), and AL10 ($6.10 \pm 0.34\%$) when compared to time zero.

The highest ($p \leq 0.05$) relative abundances of *Bifidobacterium* spp. at 24 and 48 h of fermentation were found in media with ALA5 ($4.15 \pm 0.25 - 9.2 \pm 0.56\%$) and FOS ($4.09 \pm 0.18 - 9.35 \pm 0.68\%$), followed by media with GLA5 ($2.86 \pm 0.22 - 7.65 \pm 0.47\%$), GL10 ($1.12 \pm 0.18 - 6.62 \pm 0.44\%$), and AL10 ($3.38 \pm 0.28 - 4.45 \pm 0.51\%$). The relative abundance of *Bifidobacterium* spp. decreased ($p \leq 0.05$) in NC at 48 h of fermentation.

The highest ($p \leq 0.05$) relative abundances of *R. albus*/*R. flavefaciens* at 24 and 48 h of fermentation were found in medium with ALA5 ($6.96 \pm 0.39 - 12.79 \pm 0.88\%$). Similar ($p > 0.05$) relative abundances of *R. albus*/*R. flavefaciens* were found in media with FOS ($9.75 \pm 0.63\%$), GLA5 ($9.68 \pm 0.74\%$), and GL10 ($9.14 \pm 0.65\%$) at 48 h of fermentation, while a lowest relative abundance ($4.08 \pm 0.52\%$) was found in medium with AL10. The relative abundance of *R. albus*/*R. flavefaciens* decreased ($p \leq 0.05$) in NC during the 48 h of fermentation.

The relative abundance of *Bacteroides* spp./*Prevotella* spp. decreased ($p \leq 0.05$) in media with AL10 ($1.62 \pm 0.28\%$) and GLA5 ($2.33 \pm 0.37\%$) at 24 h of fermentation. The relative abundance of *Bacteroides* spp./*Prevotella* spp. increased ($p \leq 0.05$) in the different media at 48 h of fermentation compared to time zero, except for the medium with GLA5.

Medium with GL10 ($0.42 \pm 0.15 - 0.67 \pm 0.13\%$) had the lowest ($p \leq 0.05$) relative abundance of *Bacteroides* spp./*Prevotella* spp. during the 48 h of fermentation.

The lowest ($p \leq 0.05$) relative abundances of *C. histolyticum* at 24 and 48 h of fermentation were found in media with AL10 ($1.92 \pm 0.28 - 1.16 \pm 0.16\%$) and GL10 ($1.85 \pm 0.31 - 0.88 \pm 0.16\%$). The relative abundance of *C. histolyticum* was lower ($p \leq 0.05$) in all the media at 48 h of fermentation when compared to time zero, except for NC. Medium with ALA5 had a three-fold decrease in the relative abundance of *C. histolyticum* ($10.66 \pm 0.98 - 3.33 \pm 0.42\%$) at 48 h of fermentation compared to time zero.

The relative abundance of *E. rectale*/*C. coccoides* decreased ($p \leq 0.05$) in the media with FOS ($7.0 \pm 0.48 - 5.60 \pm 0.32\%$) and GL10 ($1.47 \pm 0.29 - 0.30 \pm 0.11\%$) at 24 and 48 h of fermentation, while it did not change ($p > 0.05$) in the medium with ALA5 and NC. The highest ($p \leq 0.05$) relative abundances of *E. rectale*/*C. coccoides* were found in the medium with GLA5 ($12.71 \pm 0.89 - 10.20 \pm 0.76\%$) at 24 and 48 h of fermentation. Medium with AL10 increased ($p \leq 0.05$) the relative abundance of *E. rectale*/*C. coccoides* during the 48 h of fermentation.

3.2 Microbial metabolic activity during in vitro fecal fermentation

The pH values decreased ($p \leq 0.05$) in the medium with AL10, ALA5, GL10, GLA5, and FOS during the 48 h of fecal fermentation (Table 2). The lowest pH value ($p \leq 0.05$) at 24 h of fermentation was found in the medium with AL10 (3.38 ± 0.03), followed by the medium with FOS (3.56 ± 0.01). The highest ($p \leq 0.05$) pH value was found in NC (5.63 ± 0.02) at 48 h of fermentation, while the lowest pH value was found in the medium with FOS (2.60 ± 0.02). The pH values were low but did not differ in the media with AL10, ALA5, GL10, and GLA5 (3.12 ± 0.01 to 3.17 ± 0.05) ($p > 0.05$) at 48 h of fermentation. The contents of sugars (glucose, fructose, maltose, and rhamnose) decreased ($p \leq 0.05$) in the medium with AL10, ALA5, GL10,

GLA5, and FOS during the 48 h of fermentation, while sugars were not detected in NC. Rhamnose was found only in medium with AL10, ALA5, GL10, and GLA5. Glucose, fructose, and maltose (0.15 ± 0.01 - 3.59 ± 0.04 g/L) were detected only in the medium with FOS at 48 h of fermentation.

The lactic acid contents increased ($p \leq 0.05$) in the media with AL10, ALA5, GL10, GLA5, and FOS at 24 h of fermentation. However, lactic acid was detected in the medium with FOS (7.83 ± 0.05 g/L) at 48 h of fermentation. The contents of acetic and butyric acids increased ($p \leq 0.05$) during the 48 h of fermentation in the media with AL10, ALA5, GL10, GLA5, and FOS, which were higher than ($p \leq 0.05$) in NC. The media with AL10 and GL10 had higher contents of butyric acid (2.03 ± 0.01 g/L – 2.11 ± 0.06) at 48 h of fermentation. The medium with FOS had the highest ($p \leq 0.05$) contents of acetic acid (2.13 ± 0.02 g/L) after 48 h of fermentation. Propionic acid was detected in all the analyzed fermentation media; however, the contents of propionic acid decreased ($p \leq 0.05$) during 48 h of fermentation.

The RMN-global metabolic profiling identified 60 different chemical compounds in the media with AL10, ALA5, GL10, GLA5, FOS, and NC at zero and 48 h of fecal fermentation (Figure 1 and Supplementary material data, Table S2). Alanine, lysine, ornithine, methylamine, trimethylamine, putrescine, malonate, and gamma-aminobutyric acid (GABA), as well as several organic acids (acetic, succinic, and formic acids) were identified in all the analyzed media at zero and 48 h of fecal fermentation (Figure 1). However, some compounds, such as leucine, isoleucine, valine, methionine, tryptophan, hypoxanthine, and 3-hydroxy isovalerate, detected at the beginning of the fermentation lost signal intensity at 48 h of fermentation in media with AL10, ALA5, GL10, and GLA5. Some compounds were detected only at 48 h of fermentation, notably threonine and 3-hydroxyisovalerate. Sugars (fructose, α -xylose, β -xylose, β -glucose, α -glucose, and D-galactose) had a reduction or loss of signals (not detection) at 48 h of fermentation.

3.3 Changes in phenolic compounds and antioxidant capacity during *in vitro* fecal fermentation

Ten distinct phenolic compounds belonging to three distinct classes were identified in the media with AL10, ALA5, GL10, and GLA5 during the 48 h of fecal fermentation: two phenolic acids, six flavonoids, and two flavonols (Table 3). Gallic acid, procyanidin A2, procyanidin B1, procyanidin B2, and epigallocatechin gallate were the most prevalent phenolic compounds in all analyzed media during fermentation (Table 4). The contents of procyanidin A2, procyanidin B1, and procyanidin B2 reduced ($p \leq 0.05$) at 24 or 48 h of fermentation, while the contents of epigallocatechin gallate increased ($p \leq 0.05$) at 24 or 48 h of fermentation. Gallic acid was detected at 24 h of fermentation in all the analyzed media, and its contents decreased ($p \leq 0.05$) at 48 h of fermentation.

The antioxidant capacity was increased ($p \leq 0.05$) or maintained ($p > 0.05$) at all the analyzed media during 48 h of fecal fermentation, except for the media with GLA10 and GLA5, in which the antioxidant capacity decreased when measured using the FRAP method (Table 3). Media with ALA5 and GLA5 ($28.79 \pm 0.22 \mu\text{mol/g}$ and $28.50 \pm 0.15 \mu\text{mol/g}$, respectively) had higher antioxidant capacity ($p \leq 0.05$) at 48 h of fermentation compared to time zero when measured with ABTS method.

3.4 Chemometric analysis

The PCA results (Figure 2A) located the media with AL10, ALA5, GL10, GLA5, and FOS at 48 h of fecal fermentation in the upper quadrant with the higher contents of SCFA and lactic acid, a higher relative abundance of *Lactobacillus* spp./*Enterococcus* spp., *Bifidobacterium* spp., and *R. albus*/*R. flavefaciens*, as well as the highest antioxidant capacity measured with the ABTS method. NC at 24 and 48 h of fermentation was in the lower right quadrant with a higher relative abundance of *C. histolyticum* and *E. rectale*/*C. coccoides*.

The Pearson's correlation test (Figure 2B) showed that *Lactobacillus* spp./*Enterococcus* spp., *Bifidobacterium* spp., and *R. albus*/*R. flavefaciens* correlated positively ($p < 0.001$) with lactic, acetic, and butyric acids, and antioxidant capacity measured with the ABTS method while correlating negatively ($p < 0.001$) with pH values. *Bacteroides* spp./*Prevotella* spp., *C. histolyticum*, and *E. rectale*/*C. coccoides* were negatively correlated ($p < 0.001$) with antioxidant capacity measured with the ABTS and FRAP methods while correlating positively ($p < 0.001$) with pH values and sugars (glucose, fructose, and maltose).

4. Discussion

Acerola and guava co-product/s fermented with probiotic *L. acidophilus* and *L. paracasei* promoted increases in relative abundance of *Lactobacillus* spp./*Enterococcus* spp. and *Bifidobacterium* spp. populations during 48 h of fecal fermentation, which indicates high amounts of non-digestible compounds in these materials, such as insoluble and soluble fibers and phenolic compounds used as substrates by these intestinal microorganisms [4]. *Lactobacillus* spp. and *Bifidobacterium* spp. are the major microbial targets linked to human intestinal health, being widely used as probiotics and determinants of the prebiotic effects of various foods, while some *Enterococcus* species found in the healthy intestinal microbiota are considered potentially probiotics [33, 42]. The increase in the relative abundance of *Lactobacillus* spp./*Enterococcus* spp. in the media with AL10, ALA5, GL10, and GLA5 during fecal fermentation could be partially linked to the presence of the fermentative probiotic strains, which kept viable cell counts of >9 log CFU/g in tested fermented fruit co-product/s (Table 1). Although the beneficial effects of probiotics are strain and dose-dependent, these viable cell counts are greater than the minimum of 6 log CFU/g commonly reported to reach the claimed beneficial effects to consumers [43].

R. albus/R. flavefaciens are emerging beneficial intestinal bacterial species and more abundant in healthy individuals, acting as cellulolytic bacteria and playing an important role in fiber breakdown in the human intestine [44,45]. The increase in the relative abundance of *R. albus/R. flavefaciens* during fecal fermentation could be related to the presence of probiotic lactobacilli in the media with AL10, ALA5, GL10, and GLA5 (Table 1) since these probiotics could become the environment more favorable for *Ruminococcus* species [46]. Increased *Lactobacillus* spp., *Bifidobacterium* spp., and *Ruminococcus* spp. populations help to ameliorate intestinal diseases (*e.g.*, inflammatory bowel disease and irritable bowel syndrome), metabolic (obesity, diabetes, and cardiovascular disease), and immune-related diseases, in addition to acting in the gut-brain axis with neuroprotective and antidepressant effects [45, 47-49].

Bacteroides spp./*Prevotella* spp. can break down high molecular weight polysaccharides, such as insoluble and soluble fiber, in the fermented acerola and guava co-product/s to produce acetic acid and mainly propionic acid [50]. The media with AL10, ALA5, GL10, and GLA5 maintained or reduced the relative abundance of *Bacteroides* spp./*Prevotella* spp. up to 24 h of fecal fermentation, which could be a positive effect since increased populations of these commonly opportunistic bacteria are linked to undesirable outcomes in intestinal health, while less abundant populations are typically considered beneficial to intestinal health [46, 51].

C. histolyticum is a well-known enteric pathogen, and a decreased relative abundance of this bacterium during fecal fermentation could reinforce the selective stimulatory effects of the fermented acerola and guava co-product/s on beneficial groups forming the intestinal microbiota [52]. The decrease in the relative abundance of *C. histolyticum* could be due to a decrease in pH values and an increase in amounts of specific phenolic compounds (*e.g.*, gallic

acid, procyanidin B2, and epigallocatechin gallate) during fecal fermentation, which are limiting factors for *C. histolyticum* growth [53].

The relative abundance of *E. rectale*/*C. coccoides* varied in the media with ACE and GUA during fecal fermentation. *E. rectale*/*C. coccoides* belong to the *Clostridium* cluster XIVa, which are important regulators of intestinal homeostasis. However, to evaluate potential prebiotic effects, these species have not been included as beneficial due to safety and probiotic efficacy limitations [54].

The sugars, such as glucose, fructose, maltose, and rhamnose, were metabolized in the media with AL10, ALA5, GL10, GLA5, and FOS during fecal fermentation, indicating an intense fermentative microbial metabolic activity [31, 55]. This activity resulted in the production of organic acids, leading to a gradual decrease in pH over time (Table 2). These conditions could favor increased absorption of certain nutrients while inhibiting the growth of pathogenic microorganisms [56].

SCFA are volatile fatty acids produced in the large intestine due to the fermentation of food components by intestinal microbiota and directly linked to general intestinal health [56]. Acetic, propionic, and butyric acids are the most common SCFA generated by intestinal microbiota [57]. In this study, the simulation of fecal fermentation showed the capacity of AL10, ALA5, GL10, GLA5, and FOS to reduce the pH, especially through acetic and butyric acid production (Table 2), as also observed in Pearson's Correlation test where these acids correlated negatively with pH values. Butyric acid, belonging to the group of monocarboxylic acids, is predominantly produced by bacteria, such as *Lactobacillus* spp., *Ruminococcus* spp., and *Clostridium* spp., during the fermentation of non-digestible carbohydrates, proteins, and lactic acid [58]. Although *Clostridium* spp. is a butyric acid producer, this genus is associated with producing some toxic metabolites often considered detrimental to intestinal health [12]. At the end of the 48 h of fecal fermentation, butyric acid contents had more than a 2-fold

increase in media probiotic fermented with acerola and guava co-product/s compared to NC and FOS, which could be linked to variations in the relative abundance of *E. rectale*/*C. cocoides*, as observed a negative correlation in Pearson's test between butyric acid and EREC 482 probe. Butyric acid is the primary energy source for colonocytes, regulating gene expression and promoting anti-inflammatory and anticancer effects [59-61]. Acetic acid is a carboxylic acid associated with the metabolism of several bacterial groups, including *Lactobacillus* spp., *Bifidobacterium* spp., *Ruminococcus* spp., and *Bacteroides* spp. [62], which agrees with the results of Pearson's correlation test showing that these bacterial groups correlated positively with lactic, acetic, and butyric acids. The media with AL10, ALA5, GL10, GLA5 had increased populations of *Lactobacillus* spp., *Bifidobacterium* spp., and *Ruminococcus* spp. during fecal fermentation, which may be related to the parallel increase in the contents of acetic acid in these media [63], which also corroborates the correlations observed in Pearson's Correlation test.

The medium with FOS had higher contents of glucose and fructose, probably linked to the higher contents of lactic and acetic acids and lower pH than the other analyzed fermentation media (Table 2). This probably occurred because more straightforward carbohydrates were more available for metabolization [64] and the high relative abundance of *Lactobacillus* spp./*Enterococcus* spp. observed in medium with FOS [31]. Low contents of propionic acid were found during fecal fermentation in all analyzed fermentation media, but the lower contents of this SCFA were found in the media with GLA10 and GLA5, which may be linked to the decreased relative abundance of *Bacteroides* spp./*Prevotella* spp. therein [31, 53]. In addition, the metabolism of these bacteria can be influenced by the relatively low pH observed in *in vitro* assays, affecting directly propionic acid production [65].

Regardless of the fermentation environment, the overall metabolic profiling showed a wide range of chemical compounds commonly detected in human feces [66] in the media with

AL10, ALA5, GL10, and GLA5 during fecal fermentation. Media with AL10, ALA5, GL10, and GLA5 had a reduction in the intensity of signals related to saccharide monomers at 48 h of fecal fermentation (Table 2). Consequently, different organic acids, such as succinic, acetic, and formic acids, were mainly identified in these media (Table 2). These acids (acetic, formic, citric, succinic, and lactic acid) are produced by bacteria forming the large intestine microbiota through the fermentation of non-digestible carbohydrates [56, 67], which agree with the results of the quantification of organic acids and sugars, and pH reduction during fecal fermentation.

Several amino acids were identified in the media with AL10, ALA5, GL10, and GLA5 at 48 h of fecal fermentation, including alanine, lysine, ornithine, proline, tyrosine, and threonine. Identifying these amino acids could be due to a predominantly saccharolytic metabolism in most intestinal microorganisms, which inhibits the fermentation of amino acids in favor of carbohydrates [68]. Therefore, the presence of non-digestible carbohydrates in fermentation media may have stimulated bacteria with saccharolytic metabolism to produce organic acids. Despite this, there was still a reduction in the signals of some amino acids, such as isoleucine, valine, leucine, lysine, and methionine, during fecal fermentation. Many of these amino acids can participate in several metabolic pathways involving amino acids, carbohydrates, and nucleotides [69,70]. Threonine could stand out among the amino acids detected at 48 h of fermentation since it is essential in maintaining mucosal integrity and barrier function by supporting mucin secretion [71].

Phenolic compounds and the intestinal microbiota have a mutually beneficial relationship since the intestinal microbiota metabolizes phenolic compounds into absorbable and more accessible derived metabolites, while phenolic compounds can induce increases in the abundance and diversity of commensal bacteria in the intestinal microbiota [72, 73]. The decrease in phenolic compounds during fecal fermentation indicates their metabolization by the intestinal microbiota [13]. The contents of phenolic compounds decreased in the media with

AL10, ALA5, GL10, and GLA5 during fecal fermentation, with the exception only for epigallocatechin gallate that increased or maintained the content during fecal fermentation. Interestingly, epigallocatechin gallate is associated with selective stimulation of *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* in the human colon and may serve as a substrate for beneficial intestinal microbiota [74].

The contents of gallic acid, procyanidin A2, and procyanidin B2 decreased ($p \leq 0.05$) during fecal fermentation, although these compounds were detected until 48 h of fermentation (Table 3). A previous investigation reported the conversion of procyanidins to epicatechin in an *in vitro* fecal fermentation model [75], agreeing with the results of this study. Procyanidins (free or associated with the cell wall) are poorly bioavailable in the upper part of the intestine and reach the colon to become fermentable substrates for the commensal microbiota. Although the microbial catabolism of procyanidins is far from being completely described, it is known that procyanidins coming from food matrices, such as fruits, tend to be transformed into readily absorbable low molecular weight metabolites [76-78]. *Lactobacillus* species produce gallate decarboxylase, an enzyme that degrades gallic acid into other compounds, such as oxaloacetate and pyruvate, used in the Krebs cycle [79-80]. Despite the decrease during the fecal fermentation, the presence of gallic acid is important since it could exert many beneficial effects on human health, such as acting as an antioxidant, anti-inflammatory, antidiabetic, and anticancer agent [81,82].

The antioxidant capacity overall increased or remained in all analyzed media during fecal fermentation when measured with DPPH and ABTS methods (Table 3). However, the antioxidant capacity in the media with GLA10 and GLA5 decreased when measured with the FRAP method. Different chemical properties of compounds, principles, and conditions can lead to differences in results obtained with distinct methods to assess antioxidant capacity [83]. However, the DPPH and ABTS methods are considered efficient in evaluating the antioxidant

capacity of fecal fermentation media [30]. The reported high antioxidant capacity may be due to the presence of different phenolic compounds in guava and acerola co-product/s, as well as their metabolization by the intestinal microbiota [84]. The modulation of gut microbiota can additionally enhance antioxidant capacity, as evidenced in results from Pearson's correlation test where beneficial bacterial populations (*Lactobacillus* spp./*Enterococcus* spp., *Bifidobacterium* spp., and *R. albus*/*R. flavefaciens*) positively correlated with antioxidant capacity, while not beneficial bacterial populations (*C. histolyticum* and *E. rectale*/*C. coccoides*) negatively correlated with antioxidant capacity. It suggests a potential relationship between gut microbiota composition and antioxidant capacity in the intestinal environment [85]. The presence of gallic acid, epigallocatechin gallate, and procyanidin B2 in the media with ALA5, GL10, and GLA5 at 48 h of fecal fermentation could also contribute to their high antioxidant capacity. Antioxidant capacity is essential to improve local intestinal health with systemic beneficial repercussions due to inhibiting free radical production [86].

A Principal Component Analysis (PCA) (Fig. 2A) is a statistical technique aimed at simplifying the graphical representation of data, making it easier to display and interpret multivariate results [87]. The PCA revealed that all analyzed media containing probiotic fermented acerola and guava co-products could induce favorable alterations during the 48 h of fecal fermentation, which was overall comparable to the alterations induced by FOS, a well-established prebiotic ingredient.

5. Conclusions

The fecal fermentation of AL10, ALA5, GL10, and GLA5 with probiotic lactobacilli high viable cell counts overall increased the relative abundance of bacterial populations commonly reported to benefit intestinal health, besides overall decreasing or maintaining the relative abundance of not beneficial bacterial populations. Sugars and phenolic compounds available in media with fermented acerola and guava fruit co-product/s were extensively

metabolized by intestinal microbiota during fecal fermentation, reducing pH values, increasing the production of SCFA, changing the metabolic profile, and keeping the antioxidant capacity, which putatively reinforced their potential ability to improve intestinal health. The formulated fermented acerola and guava co-products could be novel vehicles for probiotics with the capability of exerting effects on the intestinal microbiota compatible with prebiotic compounds, proving a potential strategy for its use and valorization as novel functionalized symbiotic circular ingredients to develop value-added foods and dietary supplements.

References

1. Sabino, L.B.S.; Gonzaga, M.L.C.; Oliveira, L.S.; Duarte, A.S.G.; Alexandre e Silva, L.M.; de Brito, E.S.; Figueredo, R.W.; Silva, L.M.R.; Sousa, P.H.M. Polysaccharides from acerola, cashew apple, pineapple, mango and passion fruit by-products: Structure, cytotoxicity and gastroprotective effects. *Bioact. Carbohydr. Diet. Fibre* **2020**, *24*, 100228. <https://doi.org/10.1016/j.bcdf.2020.100228>.
2. Barros, B.R.S.; Nascimento, D.K.D.; Araújo, D.R.C.; Batista, F.R.C.; Lima, A.M.N.O.; Cruz Filho, I.J.; Oliveira, M.L.; de Melo, C.M.L. Phytochemical analysis, nutritional profile and immunostimulatory activity of aqueous extract from *Malpighia emarginata* DC leaves. *Biocatal. Agric. Biotechnol.* **2020**, *23*, 101442. <https://doi.org/10.1016/j.bcab.2019.101442>.
3. Moreira-Araújo, R.S.R.; Barros, N.V.A.; Porto, R.G.C.L.; Brandão, A.C.A.S.; Lima, A.D.; Fett R. Bioactive compounds and antioxidant activity three fruit species from the Brazilian Cerrado. *Rev. Bras. Frutic.* **2019**, *41*, 1–8. <https://doi.org/10.1590/0100-294520190110-29452019011>.
4. Araújo, C.M.; Sampaio, K.B.; Menezes, F.N.D.D.; Almeida, E.T.D.C.; Lima, M.D.S.; Viera, V.B.; Garcia, E.F.; Gómez-Zavaglia, A.; Souza, E.L.; Oliveira, M.E.G. Protective effects of tropical fruit processing coproducts on probiotic *Lactobacillus* strains during freeze-drying and storage. *Microorganisms* **2020**, *8*, 96. <https://doi.org/10.3390/microorganisms8010096>.

5. Lima, R.S.; Ferreira, S.R.S.; Vitali, L.; Block, J.M. May the superfruit red guava and its processing waste be a potential ingredient in functional foods? *Food. Res. Int.* **2019**, *115*, 451-459. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2018.10.053>.
6. Lugo, S.D.R.; Kimita, K.; Nishino, N. Characteristics of decision process towards circular food economy: a review. *Cleaner Log. Supp. Chain* **2023**, *7*, 100104. <https://doi.org/10.1016/j.clscn.2023.100104>.
7. Albuquerque, M.A.C.; Levit, R.; Beres, C.; Bedani, R.; de LeBlanc, A.M.; Saad, S.M.I.; LeBlanc, J.G. Tropical fruit by-products water extracts as sources of soluble fibres and phenolic compounds with potential antioxidant, anti-inflammatory, and functional properties. *J. Funct. Foods* **2019**, *52*, 724-733. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2018.12.002>.
8. Gualberto, C.N.; de Oliveira, C.S.; Nogueira, J.P.; de Jesus, M.S.; Araujo, H.C.S.; Rajan, M.; Leite Neta, M.T.S.; Narain, N. Bioactive compounds and antioxidant activities in the agro-industrial residues of acerola (*Malpighia emarginata* L.), guava (*Psidium guajava* L.), genipap (*Genipa americana* L.) and umbu (*Spondias tuberosa* L.) fruits assisted by ultrasonic or shaker extraction. *Food Res. Int.* **2021**, *147*, 110538. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2021.110538>.
9. Miskinis, R.A.S.; do Nascimento, L.Á.; Colussi, R. Bioactive compounds from acerola pomace: a review. *Food. Chem.* **2023**, *404*, 134613. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2022.134613>.
10. Vega-Baudrit, J.R.; Camacho, M.; Batista-Menezes, D.; Corrales-Ureña, Y.; Zúñiga, J.M.; Chacón, A.M.; Lecot, N.; Henríquez, L.C.; Lopretti, M. Acerola (*Malpighia* spp.) waste: a sustainable approach to nutraceutical, pharmaceutical, and energy applications. *Recycling* **2023**, *8*, 96. <https://doi.org/10.3390/recycling8060096>.
11. Gibson, R.G.; Hutkins, R.; Sanders, M.E.; Prescott, S.L.; Reimer, R.A.; Salminen, S.J.; Scott, K.; Stanton, C.; Swanson, K.S.; Cani, P.D.; Verbeke, K.; Reid, G. The International Scientific Association for Probiotics and Prebiotics (ISAPP) consensus statement on the definition and

- scope of prebiotics. *Nat. Rev. Gastroenterol. Hepatol.* **2017**, *14*, 491–502. <https://doi.org/10.1038/nrgastro.2017.75>.
12. Wang, S.; Xiao, Y.; Tian, F.; Zhao, J.; Zhang, H.; Zhai, Q.; Chen, W. Rational use of prebiotics for gut microbiota alterations: Specific bacterial phylotypes and related mechanisms. *J. Funct. Foods* **2020**, *66*, 103838. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2020.103838>.
 13. Souza, E.L.; Albuquerque, T.M.R.; Santos, A.S.; Massa, N.M.L.; Brito Alves, J.L. Potential interactions among phenolic compounds and probiotics for mutual boosting of their health-promoting properties and food functionalities – a review. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* **2019**, *59*, 1645–1659. <https://doi.org/10.1080/10408398.2018.1425285>.
 14. Owolabi, I.O.; Dat-arun, P.; Yupanqui, C.T.; Wichienchot, S. Gut microbiota metabolism of functional carbohydrates and phenolic compounds from soaked and germinated purple rice. *J. Funct. Foods* **2020**, *66*, 103787. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2020.103787>.
 15. Menezes, F.N.D.D.; Melo, F.H.C.; Vieira, A.R.S.; Almeida, E.T.C.; Lima, M.S.; Aquino, J.S.; Gomez-Zavaglia, A.; Magnani, M. de Souza, E.L. Acerola (*Malpighia glabra* L.) and guava (*Psidium guayaba* L.) industrial processing by-products stimulate probiotic *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* growth and induce beneficial changes in colonic microbiota. *J. Appl. Microbiol.* **2021**, *130*, 1323–1336. <https://doi.org/10.1111/jam.14824>.
 16. Menezes, F.N.D.D.; Cruz Almeida, É.T.; Silva Vieira, A.R.; Souza Aquino, J.; Santos Lima, M.; Magnani, M.; Souza, E.L. Impact of cashew (*Anacardium occidentale* L.) by-product on composition and metabolic activity of human colonic microbiota *in vitro* indicates prebiotic properties. *Curr. Microbiol.* **2021**, *78*, 2264–2274. <https://doi.org/10.1007/s00284-021-02502-z>.
 17. Vaid, S.; Pandey, V.K.; Singh, R.; Dar, A.H.; Shams, R.; Thakur, K.S. A concise review on development of probiotics from *Lactobacillus* using CRISPR-Cas Technology of Gene Editing. *Food Chem. Adv.* **2022**, *1*, 100099. <https://doi.org/10.1016/j.focha.2022.100099>.

18. Bahrami, G.; Malekshahi, H.; Miraghaee, S.; Madani, H.; Babaei, A. Improving animal model of induced colitis by acetic acid in terms of fibrosis and inflammation incidence in the colon. *J. Invest. Surg.* **2022**, *35*, 214–222. <https://doi.org/10.1080/08941939.2020.1821844>.
19. Marius, F.K.E.; Marie, K.P.; Blandine, M.; Laverdure, T.P.; Daquain, F.T.U.; François, Z.N. Development of a non-dairy probiotic beverage based on sorrel and pineapple juices using *Lactocaseibacillus paracasei* 62L. *J. Agr. Food Res.* **2023**, *14*, 100688. <https://doi.org/10.1016/j.jafr.2023.100688>.
20. Xavier-Santos, D.; Lima, E.D.; Simão, A.N.C.; Bedani, R.; Saad, S.M.I. Effect of the consumption of a synbiotic diet mousse containing *Lactobacillus acidophilus* La-5 by individuals with metabolic syndrome: a randomized controlled trial. *J. Funct. Foods* **2018**, *41*, 55–61. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2017.12.041>.
21. Fenster, K.; Freeburg, B.; Hollard, C.; Wong, C.; Rønhave Laursen, R.; Ouwehand, A.C. The production and delivery of probiotics: a review of a practical approach. *Microorganisms* **2019**, *7*, 83. <https://doi.org/10.3390/microorganisms7030083>.
22. Oliveira, S.P.A.; Nascimento, H.M.A.; Sampaio, K.B.; Souza, E.L. A review on bioactive compounds of beet (*Beta vulgaris* L. subsp. *vulgaris*) with special emphasis on their beneficial effects on gut microbiota and gastrointestinal health. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* **2020**, *61*, 2022–2033. <https://doi.org/10.1080/10408398.2020.1768510>.
23. Shori, A.B.; Aljohani, G.S.; Al-zahrani, A.J.; Al-sulbi, O.S.; Baba, A.S. Viability of probiotics and antioxidant activity of cashew milk-based yogurt fermented with selected strains of probiotic *Lactobacillus* spp. *LWT - Food Sci. Technol.* **2022**, *153*, 112482. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2021.112482>.
24. Sanders, M.E.; Marco, M.L. Food formats for effective delivery of probiotics. *Annu. Rev. Food Sci. Technol.* **2010**, *1*, 65–85. <https://doi.org/10.1146/annurev.food.080708.100743>.

25. Duarte, F.N.D.; Rodrigues, J.B.; Costa Lima, M.; Lima, M.D.S.; Pacheco, M.T.B.; Pintado, M.M.E.; Aquino, J.S.; de Souza, E.L. Potential prebiotic properties of cashew apple (*Anacardium occidentale* L.) agro-industrial byproduct on *Lactobacillus* species. *J. Sci. Food Agric.* **2017**, *97*, 3712–3719. <https://doi.org/10.1002/jsfa.8232>.
26. Nunes, G.L.; Etchepare, M.A.; Cichoski, A.J.; Zepka, L.Q.; Lopes, E.J.; Barin, J.S.; Flores, E.M.M.; Silva, C.B.; Menezes, C.R. Inulin, hi-maize, and trehalose as thermal protectants for increasing viability of *Lactobacillus acidophilus* encapsulated by spray drying. *LWT – Food. Sci. Technol.* **2018**, *89*, 128–133. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2017.10.032>.
27. Sousa, S.; Pinto, J.; Pereira, C.; Malcata, F.X.; Pacheco, M.T.B.; Gomes, A.M.; Pintado, M. *In vitro* evaluation of yacon (*Smallanthus sonchifolius*) tuber flour prebiotic potential. *Food Bioprod. Process.* **2015**, *95*, 96–105. <https://doi.org/10.1016/j.fbp.2015.04.003>.
28. Garcia, E.F.; Oliveira Araújo, A.; Luciano, W.A.; Albuquerque, T.M.R.; Oliveira Arcanjo, N.M.; Madruga, M.S.; Lima, M.S.; Magnani, M.; Saarela, M.; Souza, E.L. The performance of five fruit-derived and freeze-dried potentially probiotic *Lactobacillus* strains in apple, orange, and grape juices. *J. Sci. Food Agric.* **2018**, *98*, 5000–5010. <https://doi.org/10.1002/jsfa.9034>.
29. Sampaio, K.B.; Nascimento, Y.M.; Tavares, J.F.; Cavalcanti, M.T.; Brito Alves, J.L.; 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. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2020.128264>.
30. Sampaio, K.B.; Brito Alves, J.L.; 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. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2022.111800>.

31. Albuquerque, T.M.R.; Magnani, M.; Lima, M.D.S.; Castellano, L.R.C.; Souza, E.L. Effects of digested flours from four different sweet potato (*Ipomoea batatas* L.) root varieties on the composition and metabolic activity of human colonic microbiota *in vitro*. *J. Food Sci.* **2021**, *6*, 3707–3719. <https://doi.org/10.1111/1750-3841.15852>.
32. Rodrigues, D.; Walton, G.; Sousa, S.; Rocha-Santos, T.A.P.; Duarte, A.C.; Freitas, A.C.; Gomes, A.M.P. *In vitro* fermentation and prebiotic potential of selected extracts from seaweeds and mushrooms. *LWT - Food Sci. Technol.* **2016**, *73*, 131–139. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2016.06.004>.
33. Silva, J.Y.P.; Nascimento, H.M.A.; Albuquerque, T.M.R.; Sampaio, K.B.; Lima, M.S.; Monteiro, M.; Leite, I.B.; Silva, E.F.; Nascimento, Y.M.; Silva, M.S.; Tavares, J.F.; Brito Alves, J.L.; Oliveira, M.E.G.; Souza, E.L. 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* **2023**, <https://doi.org/10.1007/s12602-023-10134-x>.
34. Coelho, E.M.; Padilha, C.V.S.; Miskinis, G.A.; Sá, A.G.B.; Pereira, G.E.; Azevedo, L.C.; Lima, M.S. Simultaneous analysis of sugars and organic acids in wine and grape juices by HPLC: Method validation and characterization of products from northeast Brazil. *J. Food Compos. Anal.* **2018**, *66*, 160–167. <https://doi.org/10.1016/j.jfca.2017.12.017>.
35. Conterno, L.; Martinelli, F.; Tamburini, M.; Fava, F.; Mancini, A.; Sordo, M.; Pindo, M.; Martens, S.; Masuero, D.; Vrhovsek, U.; Lago, C.D.; Ferrario, G.; Morandini, M.; Tuohy, K. Measuring the impact of olive pomace enriched biscuits on the gut microbiota and its metabolic activity in mildly hypercholesterolaemic subjects. *Eur. J. Nutr.* **2017**, *58*, 63–81. <https://doi.org/10.1007/s00394-017-1572-2>.

36. Daims, H.; Stoecker, K.; Wagner M. Fluorescence *in situ* hybridization for the detection of prokaryotes. In *Current Opinion in Microbiology*, Osborn, A.M., Smith, C.J., Eds.; Molecular Microbial Ecology: Garland Science, Abingdon, UK, 2003; Volume 6, Chapter 9, pp. 213–239.
37. AOAC. *Official Methods of Analysis*. 21st Ed.; AOAC International, Arlington, 2019; ISBN: 978-0935584899.
38. Padilha, C.V.S.; Miskinis, G.A.; de Souza, M.E.A.O.; Pereira, G.E.; de Oliveira, D.; Bordignon-Luiz, M.T.; dos Santos Lima, M. Rapid determination of flavonoids and phenolic acids in grape juices and wines by RP-HPLC/DAD: Method validation and characterization of commercial products of the new Brazilian varieties of grape. *Food Chem.* **2017**, 228, 106-115. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2017.01.137>.
39. 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.; Brito Alves, J.L.; 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**, 16, 13-25. <https://doi.org/10.1007/s12602-022-10011-z>.
40. Brand-Williams, W.; Cuvelier, M.E.; Berset, C. (1995) Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *LWT – Food. Sci. Technol.* **1995**, 28, 25–30. [https://doi.org/10.1016/S0023-6438\(95\)80008-5](https://doi.org/10.1016/S0023-6438(95)80008-5).
41. Re, R.; Pellegrini, N.; Proteggente, A.; Pannala, A.; Yang, M.; Rice-Evans, C. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radic. Biol. Med.* **1999**, 26, 1231–1237. [https://doi.org/10.1016/s0891-5849\(98\)00315-3](https://doi.org/10.1016/s0891-5849(98)00315-3)
42. Azad, M.A.K.; Sarker, M.; Li, T.; Yin, J. Probiotic species in the modulation of gut microbiota: an overview. *Biomed. Res. Int.* **2018**, 2018, 9478630. <https://doi.org/10.1155/2018/9478630>.

43. Gomes, I.A.; Venâncio, A.; Lima, J.P.; Freitas-Silva, O. Fruit-based non-dairy beverage: A new approach for probiotics. *Adv. Biol. Chem.* **2021**, *11*, 302-330. <https://doi.org/10.4236/abc.2021.116021>.
44. Cuevas-Sierra, A.; Milagro, F.I.; Guruceaga, E.; Cuervo, M.; Goni, L.; García-Granero, M.; Martinez, J.A.; Riezu-Boj, J.I. A weight-loss model based on baseline microbiota and genetic scores for selection of dietary treatments in overweight and obese population. *Clin. Nutr.* **2022**, *41*, 1712-1723. <https://doi.org/10.1016/j.clnu.2022.06.008>.
45. Park, J.; Lee, J.; Yeom, Z.; Heo, D.; Lim, Y.H. Neuroprotective effect of *Ruminococcus albus* on oxidatively stressed SH-SY5Y cells and animals. *Sci. Rep.* **2017**, *7*, 14520. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-15163-5>.
46. Wang, Y.; Qu, S.; Chen, M.; Cui, Y.; Shi, C.; Pu, X.; Gao, W.; Li, Q.; Han, J.; Zhang, A. Effects of buckwheat milk co-fermented with two probiotics and two commercial yoghurt strains on gut microbiota and production of short-chain fatty acids. *Food Biosci.* **2023**, *53*, 102537. <https://doi.org/10.1016/j.fbio.2023.102537>.
47. Gomaa, E.Z. Human gut microbiota/microbiome in health and diseases: a review. *Antonie van Leeuwenhoek* **2020**, *113*, 2019–2040. <https://doi.org/10.1007/s10482-020-01474-7>.
48. Lukić, I.; Getselter, D.; Ziv, O.; Oron, O.; Reuveni, E.; Koren, O.; Elliott E. Antidepressants affect gut microbiota and *Ruminococcus flavefaciens* is able to abolish their effects on depressive-like behavior. *Transl. Psychiatry* **2019**, *9*, 133. <https://doi.org/10.1038/s41398-019-0466-x>.
49. Ni, Y.; Zhang, Y.; Zheng, L.; Rong, N.; Yang, Y.; Gong, P.; Yang, Y.; Siwu, X.; Zhang, C.; Zhu, L.; Fu, Z. *Bifidobacterium* and *Lactobacillus* improve inflammatory bowel disease in zebrafish of different ages by regulating the intestinal mucosal barrier and microbiota. *Life Sci.* **2023**, *324*, 121699. <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2023.121699>.

50. Diotallevi, C.; Gaudio, G.; Fava, F.; Angeli, A.; Lotti, C.; Vrhovsek, U.; Rinott, E.; Shai, I.; Gobbetti, M.; Tuohy, K. Measuring the effect of Mankai® (*Wolffia globosa*) on the gut microbiota and its metabolic output using an *in vitro* colon model. *J. Funct. Foods* **2021**, *84*, 104597. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2021.104597>.
51. Iljazovic, A.; Amend, L.; Galvez, E.J.C.; Oliveira, R.; Strowing T. Modulation of inflammatory responses by gastrointestinal *Prevotella* spp. – From associations to functional studies. *J. Med. Microbiol.* **2021**, *311*, 151472. <https://doi.org/10.1016/j.ijmm.2021.151472>.
52. Liu, C.; Kolida, S.; Charalampopoulos, D.; Rastall, R.A. An evaluation of the prebiotic potential of microbial levans from *Erwinia* sp. 10119. *J. Funct. Foods.* **2020**, *64*, 103668. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2019.103668>.
53. Oliveira, S.P.A.; Albuquerque, T.M.R.; Massa, N.M.L.; Rodrigues, N.P.A.; Sampaio, K.B.; Nascimento, H.M.A.; Lima, M.S.; Conceição, M.L.; Souza, E.L. Investigating the effects of conventional and unconventional edible parts of red beet (*Beta vulgaris* L.) on target bacterial groups and metabolic activity of human colonic microbiota to produce novel and sustainable prebiotic ingredients. *Food. Res. Int.* **2023**, *171*, 112998. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2023.112998>.
54. Guo, P.; Zhang, K.; Ma, X.; He, P. *Clostridium* species as probiotics: potentials and challenges. *J. Anim. Sci. Biotechnol.* **2020**, *11*, 24. <https://doi.org/10.1186/s40104-019-0402-1>.
55. Massa, N.M.L.; de Oliveira, S.P.A.; Rodrigues, N.P.A.; Menezes, F.N.D.D.; dos Santos Lima, M.; Magnani, M.; de Souza, E.L. *In vitro* colonic fermentation and potential prebiotic properties of pre-digested jaboticaba (*Myrciaria jaboticaba* (Vell.) Berg) by-products. *Food Chem.* **2022**, *388*, 133003. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2022.133003>.
56. Ríos-Covián, D.; Ruas-Madiedo, P.; Margolles, A.; Gueimonde, M.; de Los Reyes-Gavilán, C.G.; Salazar, N. Intestinal short chain fatty acids and their link with diet and human health. *Front. Microbiol.* **2016**, *7*, 185. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.00185>.

57. Szczuko, M.; Kikut, J.; Maciejewska, D.; Kulpa, D.; Celewicz, Z.; Ziętek, M. The associations of SCFA with anthropometric parameters and carbohydrate metabolism in pregnant women. *Int. J. Mol. Sci.* **2020**, *21*, 9212. <https://doi.org/10.3390/ijms21239212>.
58. Hsiao, Y.P.; Chen, H.L.; Tsai, J.N.; Lin, M.Y.; Liao, J.W.; Wei, M.S.; Ko, J.L.; Ou, C.C. Administration of *Lactobacillus reuteri* combined with *Clostridium butyricum* attenuates cisplatin-induced renal damage by gut microbiota reconstitution, increasing butyric acid production, and suppressing renal inflammation. *Nutrients*, **2021**, *13*, 2792. <https://doi.org/10.3390/nu13082792>.
59. Hamer, H.M.; Jonkers, D.M.; Bast, A.; Vanhoutvin, S.A.; Fischer, M.A.; Kodde, A.; Troost, F.J.; Venema, K.; Brummer, R.M. Butyrate modulates oxidative stress in the colonic mucosa of healthy humans. *Clin. Nutr.* **2009**, *28*, 88–93. <https://doi.org/10.1016/j.clnu.2008.11.002>.
60. Koh, A. De Vadder, F.; Kovatcheva-Datchary, P.; Backhed, F. From dietary fiber to host physiology: Short-chain fatty acids as key bacterial metabolites. *Cell* **2016**, *165*, 1332–1345. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2016.05.041>.
61. Liu, H.; Wang, J.; He, T.; Becker, S.; Zhang, G.; Li, D.; Ma, X. Butyrate: A double-edged sword for health? *Adv. Nutr.* **2018**, *9*, 21–29. <https://doi.org/10.1093/advances/nmx009>.
62. Evdokimova, S.A.; Karetkin, B.A.; Guseva, E.V.; Gordienko, M.G.; Khabibulina, N.V.; Panfilov, V.I.; Menshutina, N.V.; Gradova, N.B. A study and modeling of *Bifidobacterium* and *Bacillus* coculture continuous fermentation under distal intestine simulated conditions. *Microorganisms* **2022**, *10*, 929. <https://doi.org/10.3390/microorganisms10050929>.
63. Chen, W.; Zhang, L.; Zhao, L.; Yan, F.; Zhu, X.; Lu, Q.; Liu, R. Metabolomic profiles of A-type procyanidin dimer and trimer with gut microbiota *in vitro*. *J. Funct. Foods* **2021**, *85*, 104637. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2021.104637>.
64. Chen, G.J.; Hong, Q.Y.; Ji, N.; Wu, W.N.; Ma, L.Z. Influences of different drying methods on the structural characteristics and prebiotic activity of polysaccharides from bamboo shoot

- (*Chimonobambusa quadrangularis*) residues. *Int. J. Biol. Macromol.* **2020**, *155*, 674–684. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2020.03.223>.
65. Chen, T.; Long, W.; Zhang, C.; Liu, S.; Zhao, L.; Hamaker, B.R. Fiber-utilizing capacity varies in *Prevotella* - versus *Bacteroides* -dominated gut microbiota. *Sci. Rep.* **2017**, *7*, 2594. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-02995-4>
 66. Kim, H.K.; Kostidis, S.; Choi, Y.H. NMR analysis of fecal samples. *Methods Mol. Biol.* **2018**, *1730*, 317–328. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-7592-1_24.
 67. Kaczmarczyk, O.; Dąbek-Drobny, A.; Woźniakiewicz, M.; Paśko, P.; Dobrowolska-Iwanek, J.; Woźniakiewicz, A.; Piątek-Guziewicz, A.; Zagrodzki, P.; Mach, T.; Zwolińska-Wcisło, M. Fecal levels of lactic, succinic and short-chain fatty acids in patients with ulcerative colitis and crohn disease: a pilot study. *J. Clin. Med.* **2021**, *10*, 4701. <https://doi.org/10.3390/jcm10204701>
 68. Bianchi, F.; Lopes, N.P.; Adorno, M.A.T.; Sakamoto IK, Genovese MI, Saad SMI, Sivieri K. (2019) Impact of combining acerola by-product with a probiotic strain on a gut microbiome model. *Int. J. Food Sci. Nutr.* **2019**, *70*, 182-194. doi: <https://doi.org/10.1080/09637486.2018.1498065>.
 69. Duan, H.; Yu, Q.; Ni, Y.; Li, J.; Fan, L. Effect of *Agaricus bisporus* Polysaccharides on human gut microbiota during *in vitro* fermentation: an integrative analysis of microbiome and metabolome. *Foods* **2023**, *12*, 859. <https://doi.org/10.3390/foods12040859>.
 70. Li, X.; Zhang, Z.H.; Zabeed, H.M.; Yun, J.; Zhang, G.; Qi, X. An insight into the roles of dietary tryptophan and its metabolites in intestinal inflammation and inflammatory bowel disease. *Mol. Nutr. Food Res.* 2021, *65*, 2000461. <https://doi.org/10.1002/mnfr.20200461>.
 71. Jaafar, M.H.; Xu, P.; Mageswaran, U-M.; Balasubramaniam, S-D.; Solayappan, M.; Woon, J-J.; The, CS-J.; Todorov, S.D.; Park, Y-H.; Liu, G.; Liong, M-T. Constipation anti-aging effects by dairy-based lactic acid bacteria. *J. Anim. Sci. Technol.* **2024**, *66*, 178-203. <https://doi.org/10.5187/jast.2023.e93>.

72. Oliveira, F.L.; Arruda, T.Y.P.; Morzelle, M.C.; Pereira, A.P.A.; Casarotti, S.N. Fruit by-products as potential prebiotics and promising functional ingredients to produce fermented milk. *Food Res. Int.* **2022**, *161*, 111841. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2022.111841>.
73. Ozdal, T.; Sela, D.A.; Xiao, J.B.; Boyacioglu, D.; Chen, F.; Capanoglu, E. The reciprocal interactions between polyphenols and gut microbiota and effects on bioaccessibility. *Nutrients* **2016**, *8*, 36. <https://doi.org/10.3390/nu8020078>.
74. Liu, Z.; de Bruijn, W.J.C.; Bruins, M.E.; Vincken, J.P. Microbial metabolism of theaflavin-3,3'-digallate and its gut microbiota composition modulatory effects. *J. Agr. Food Chem.* **2021**, *69*, 232–245. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.0c06622>.
75. Stoupi, S.; Williamson, G.; Drynan, J.W.; Barron, D.; Clifford, M.N. A comparison of the *in vitro* biotransformation of (-)-epicatechin and procyanidin B2 by human faecal microbiota. *Mol Nutr Food Res.* **2010**, *54*, 747–759. <https://doi.org/10.1002/mnfr.200900123>.
76. Bazzocco, S.; Mattila, I.; Guyot, S.; Renard, C.M.; Aura, A.M. Factors affecting the conversion of apple polyphenols to phenolic acids and fruit matrix to short-chain fatty acids by human faecal microbiota *in vitro*. *Eur. J. Nutr.* **2008**, *47*, 442–452. <https://doi.org/10.1007/s00394-008-0747-2>.
77. Le Bourvellec, C.; Vilas Boas, P.B.; Lepercq, P.; Comtet-MarreS.; Auffret, P.; Ruiz, P.; Bott, R.; Renard, C.M.G.C.; Dufour, C.; Chatel, J.M.; Mosoni, P. Procyanidin-cell wall interactions within apple matrices decrease the metabolization of procyanidins by the human gut microbiota and the anti-inflammatory effect of the resulting microbial metabolome *in vitro*. *Nutrients* **2019**, *11*, 664. <https://doi.org/10.3390/nu11030664>.
78. Saura-Calixto, F.; Pérez-Jiménez, J.; Touriño, S.; Serrano, J.; Fuguet, E.; Torres, J.L.; Goñi, I. Proanthocyanidin metabolites associated with dietary fibre from *in vitro* colonic fermentation and proanthocyanidin metabolites in human plasma. *Mol. Nutr. Food Res.* **2010**, *54*, 939–946. <https://doi.org/10.1002/mnfr.200900276>.

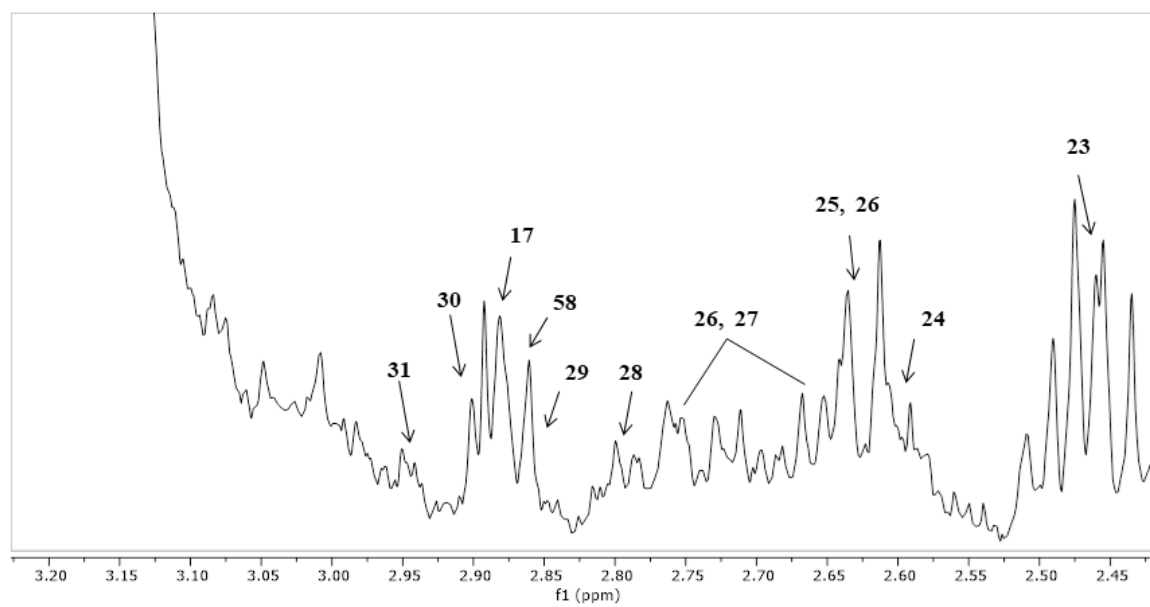
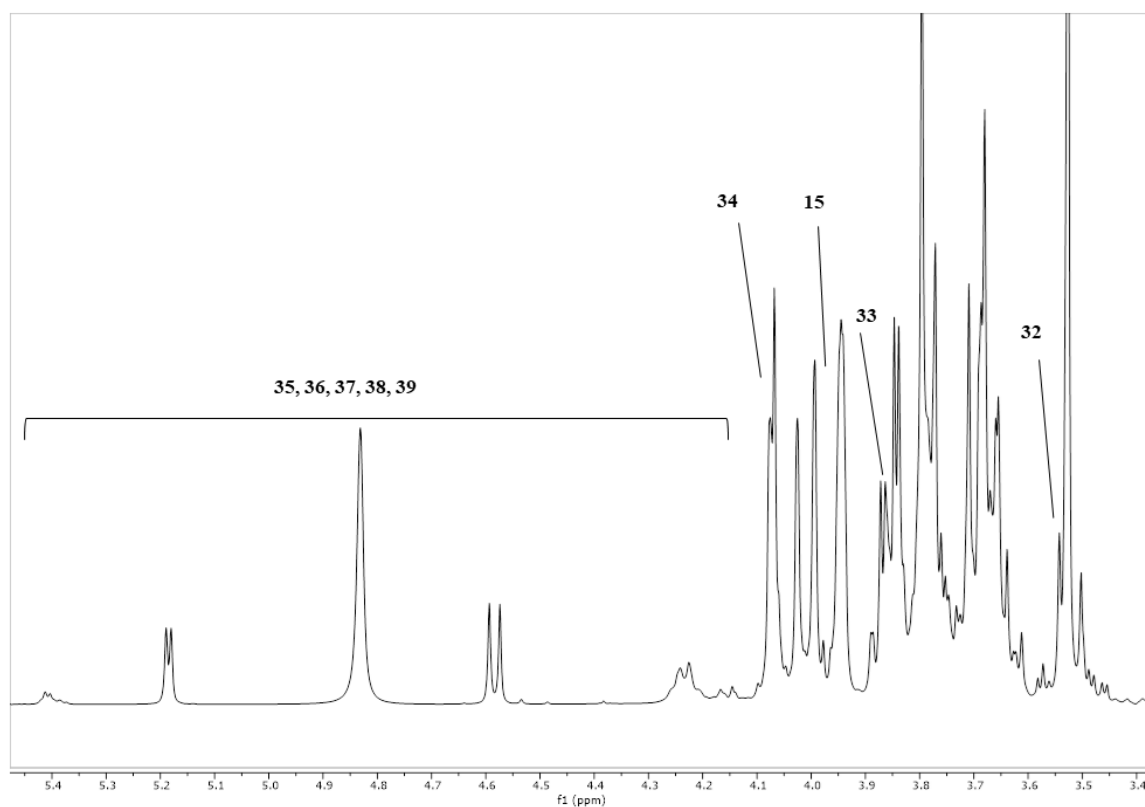
79. Jiménez-Girón, A.; Queipo-Ortuño, M.I.; Boto-Ordóñez, M.; Muñoz-González, I.; Sánchez-Patán, F.; Monagas, M.; Martín-Álvarez, P.J.; Murri, M.; Tinahones, F.J.; Andrés-Lacueva, C.; Bartolomé, B.; Moreno-Arribas, M.V. Comparative study of microbial-derived phenolic metabolites in human feces after intake of gin, red wine, and dealcoholized red wine. *J. Agric. Food Chem.* **2013**, *61*, 3909–3915. <https://doi.org/10.1021/jf400678d>.
80. Pacheco-Ordaz, R.; Wall-Medrano, A.; Goñi, M.G.; Ramos-Clamont-Montfort, G.; Ayala-Zavala, J.F.; González-Aguilar, G.A. Effect of phenolic compounds on the growth of selected probiotic and pathogenic bacteria. *Lett. Appl. Microbiol.* **2018**, *66*, 25–31. <https://doi.org/10.1111/lam.12814>.
81. Nayeem, N.; Asdaq, S.M.B.; Salem, E.; AHEl-Alfqy, S. Gallic Acid: a promising lead molecule for drug development. *J. Appl. Pharm. Sci.* **2016**, *8*, 213. <https://doi.org/10.4172/1920-4159.1000213>.
82. Sağdıçoğlu Celep, G.; Demirkaya, A.; Solak, E. Antioxidant and anticancer activities of gallic acid loaded sodium alginate microspheres on colon cancer. *Curr. Appl. Phys.* **2020**, *40*, 30-42. <https://doi.org/10.1016/j.cap.2020.06.002>.
83. Fan, S.; Li, J.; Zhang, X.; Xu, D.; Liu, X.; Dias, A.C.P.; Zhang, X.; Chen, C. A study on the identification, quantification, and biological activity of compounds from *Cornus officinalis* before and after *in vitro* gastrointestinal digestion and simulated colonic fermentation. *J. Funct. Foods* **2022**, *98*, 105272. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2022.105272>.
84. Fidelis, M.; Santos, J.S.; Escher, G.B.; Rocha, R.S.; Cruz, A.G.; Cruz, T.M.; Marques, M. B.; Nunes, J.B.; Carmo, M.A.V.; Almeida, L.A.; Kaneshima, T.; Azevedo, L.; Granato, D. Polyphenols of jabuticaba [*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 Chem.* **2021**, *334*, 127565. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2020.127565>.

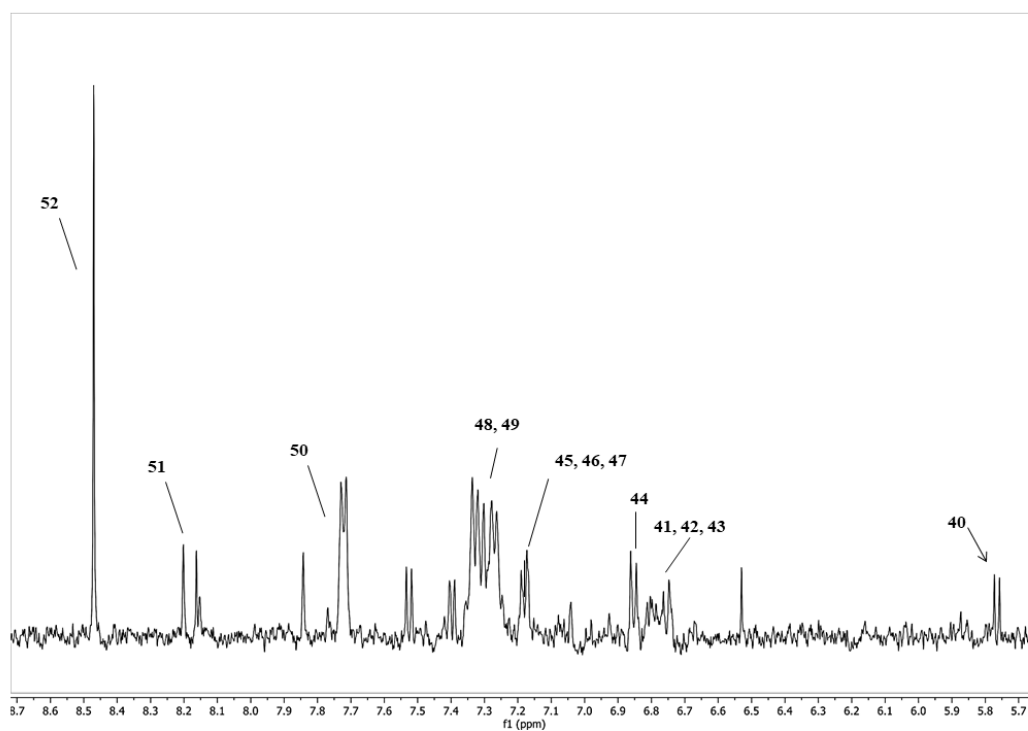
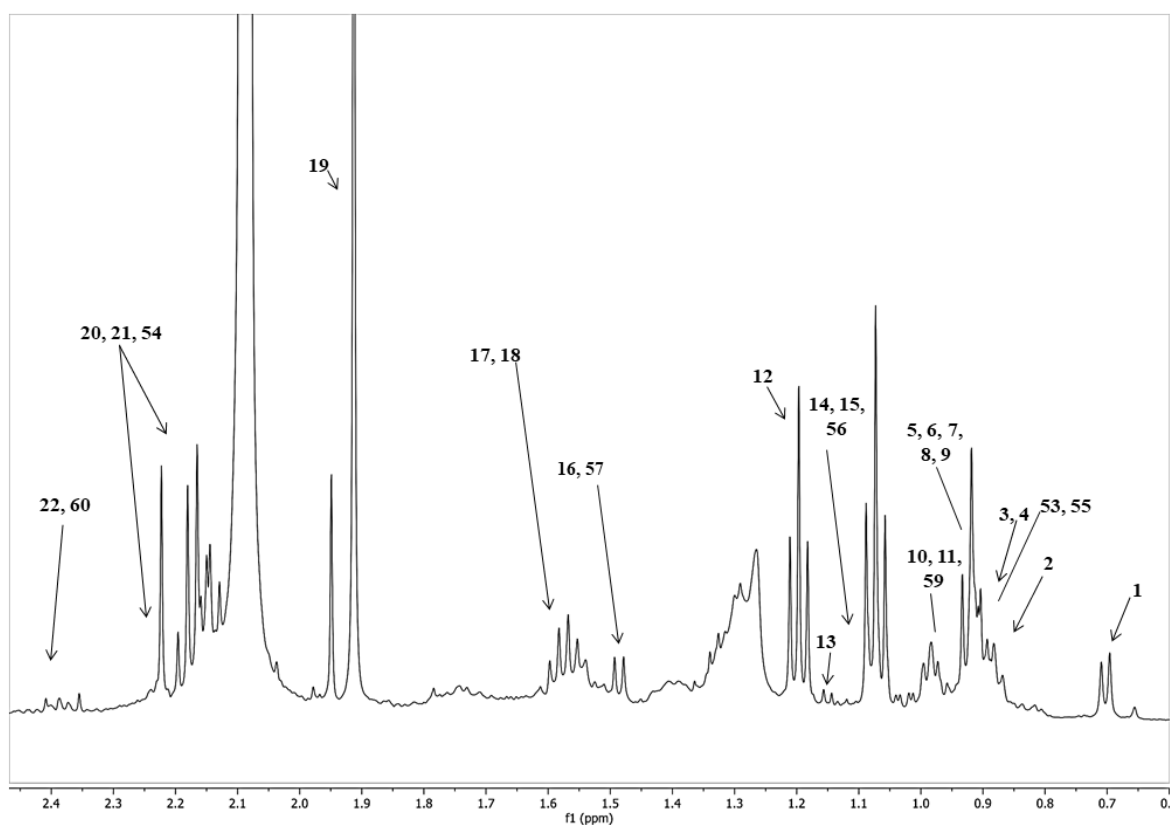
85. Pang, J.; Liu, Y.; Kang, L.; Ye, H.; Zang, J.; Wang, J.; Han, D. *Bifidobacterium animalis* promotes the growth of weaning piglets by improving intestinal development, enhancing antioxidant capacity, and modulating gut microbiota. *Appl. Environ. Microbiol.* **2022**, *88*, e0129622. <https://doi.org/10.1128/aem.01296-22>.
86. Rizzo, G. The antioxidant role of soy and soy foods in human health. *Antioxidants* **2020**, *9*, 635. <https://doi.org/10.3390/antiox9070635>.
87. Alghamdi, M.A.; Al-Ayadhi, L.; Hassan, W.M.; Bhat, R.S.; Alonazi, M.A.; El-Ansary, A. Bee pollen and probiotics may alter brain neuropeptide levels in a rodent model of autism spectrum disorders. *Metabolites* **2022**, *12*, 562. <https://doi.org/10.3390/metabo12060562>.

Figure captions

Fig. 1. Representative ^1H NMR spectra of the media with fermented acerola and guava fruit by-products digested at time 0 and 48 h of *in vitro* fecal fermentation analyzed by ^1H NMR. 1: biliary salts; 2: 2-methylbutyrate; 3: valerate; 4: n-butyrate; 5: leucine; 6: isoleucine; 7: valine; 8: propionate/propionic acid; 9: isobutyrate/butyric acid; 10: 3-methyl-2-oxoisovalerate; 11: 2-oxoisovalerate; 12: ethanol; 13: 3-hydroxybutyrate; 14: threonine; 15: lactate/lactic acid; 16: alanine; 17: lysine; 18: ornithine; 19: acetate/acetic acid; 20: proline; 21: glutamate; 22: 5-aminopentanoate; 23: succinate/succinic acid; 24: methylamine; 25: methionine; 26: citrate/citric acid; 27: aspartate; 28: asparagine; 29: trimethylamine; 30: putrescine; 31: malonate; 32: glycine; 33: fructose; 34: dihydroxyacetone; 35: α -xylose; 36: β -xylose; 37: β -glucose; 38: α -glucose; 39: β -galactose; 40: UDP-glucuronate; 41: homovanillate; 42: 3-hydroxyphenylacetate; 43: p-cresol; 44: tyrosine; 45: 5-aminosalicylate; 46: phenylalanine; 47: uracil; 48: N-acetyl-5-aminosalicylate; 49: phenylacetate; 50: tryptophan; 51: hypoxanthine; 52: formate/formic acid; 53: caprylate; 54: isocaproate; 55: isovalerate; 56: 3-hydroxyisovalerate; 57: total lipids; 58: gamma-aminobutyric acid (GABA); 59: ketoisovalerate; 60: acetone.

Fig. 2. (A) Principal Component Analysis (PCA) run for in media with fermented acerola and guava fruit by-products (AL10, ALA5, GL10, and GLA5), fructooligosaccharides (FOS), as well as in negative control (NC; without fermentable substrate) at time zero (baseline), 24, and 48 h of *in vitro* fecal fermentation (variables: relative abundance of distinct bacterial groups, contents of sugars and organic acids, and values of pH, and antioxidant activity). (B): Heat map with correlation coefficients indicates the associations between the relative abundance of distinct bacterial groups, contents of sugars and organic acids, and values of pH, , and antioxidant capacity.



**Fig. 1.**

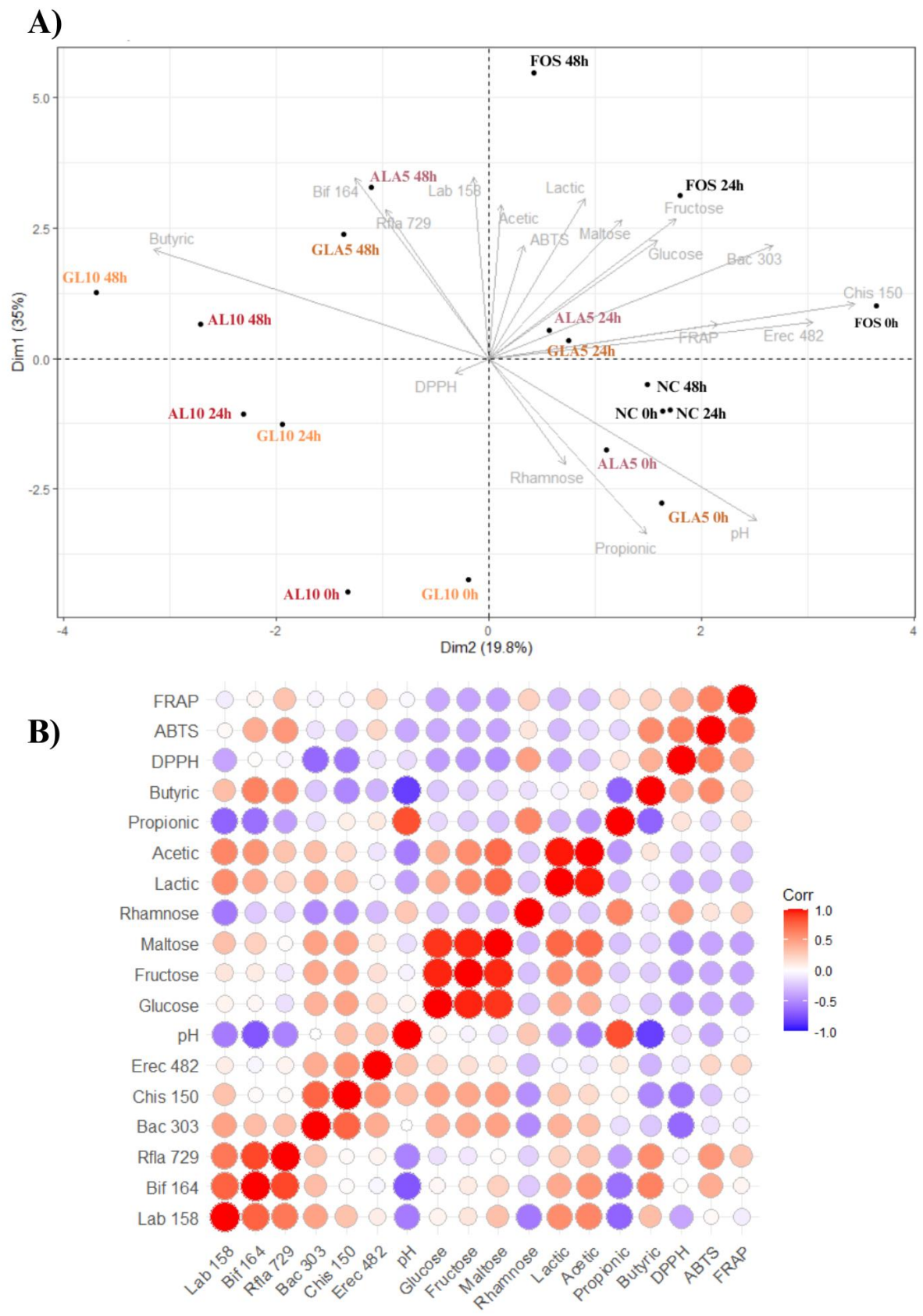


Fig. 2.

Table 1. Relative abundance (% average $\pm$ standard deviation; n = 3) of different intestinal bacterial groups in media with fermented acerola and guava fruit by-products digested (AL10, ALA5, GL10, and GLA5) and fructooligosaccharides (FOS), as well as in negative control (NC; without fermentable substrate) at zero, 24, and 48 h of *in vitro* fecal fermentation.

Bacterial groups	Fermentation medium	Fermentation period		
		0 h	24 h	48 h
<i>Lactobacillus</i> spp./ <i>Enterococcus</i> spp.	NC	5.89 $\pm$ 0.31 ^{Ba}	6.23 $\pm$ 0.35 ^{ABb}	6.68 $\pm$ 0.41 ^{Ac}
	FOS	4.81 $\pm$ 0.16 ^{Cb}	5.76 $\pm$ 0.28 ^{Bb}	12.18 $\pm$ 0.39 ^{Aa}
	AL10	3.06 $\pm$ 0.22 ^{Cc}	3.88 $\pm$ 0.17 ^{Bc}	6.10 $\pm$ 0.34 ^{Ac}
	ALA5	6.20 $\pm$ 0.28 ^{Ca}	7.00 $\pm$ 0.36 ^{Ba}	7.84 $\pm$ 0.26 ^{Ab}
	GL10	2.70 $\pm$ 0.14 ^{Cc}	4.34 $\pm$ 0.25 ^{Bc}	7.90 $\pm$ 0.28 ^{Ab}
	GLA5	2.65 $\pm$ 0.20 ^{Bc}	6.93 $\pm$ 0.31 ^{Aa}	6.40 $\pm$ 0.42 ^{Ac}
<i>Bifidobacterium</i> spp.	NC	2.43 $\pm$ 0.22 ^{Abc}	2.70 $\pm$ 0.26 ^{Ac}	1.84 $\pm$ 0.16 ^{Be}
	FOS	2.71 $\pm$ 0.20 ^{Cb}	4.09 $\pm$ 0.18 ^{Ba}	9.35 $\pm$ 0.68 ^{Aa}
	AL10	1.53 $\pm$ 0.19 ^{Cd}	3.38 $\pm$ 0.28 ^{Bb}	4.45 $\pm$ 0.51 ^{Ad}
	ALA5	3.60 $\pm$ 0.27 ^{Ca}	4.15 $\pm$ 0.25 ^{Ba}	9.20 $\pm$ 0.56 ^{Aa}
	GL10	1.44 $\pm$ 0.16 ^{Bd}	1.12 $\pm$ 0.18 ^{Bd}	6.62 $\pm$ 0.44 ^{Ac}
	GLA5	2.14 $\pm$ 0.18 ^{Cc}	2.86 $\pm$ 0.22 ^{Bc}	7.65 $\pm$ 0.47 ^{Ab}
<i>Ruminococcus albus</i> / <i>R. flavefaciens</i>	NC	5.38 $\pm$ 0.27 ^{Aa}	5.07 $\pm$ 0.24 ^{Ab}	1.77 $\pm$ 0.20 ^{Bd}
	FOS	3.0 $\pm$ 0.21 ^{Cb}	4.05 $\pm$ 0.29 ^{Bc}	9.75 $\pm$ 0.63 ^{Ab}
	AL10	1.57 $\pm$ 0.18 ^{Bd}	1.73 $\pm$ 0.12 ^{Bd}	4.08 $\pm$ 0.52 ^{Ac}
	ALA5	5.39 $\pm$ 0.30 ^{Ca}	6.96 $\pm$ 0.39 ^{Ba}	12.79 $\pm$ 0.88 ^{Aa}
	GL10	2.03 $\pm$ 0.26 ^{Cc}	4.79 $\pm$ 0.23 ^{Bbc}	9.14 $\pm$ 0.65 ^{Ab}
	GLA5	4.98 $\pm$ 0.39 ^{Ba}	4.26 $\pm$ 0.35 ^{Bc}	9.68 $\pm$ 0.74 ^{Ab}
<i>Bacteroides</i> spp./ <i>Prevotella</i> spp.	NC	6.33 $\pm$ 0.51 ^{Bb}	9.50 $\pm$ 0.64 ^{Aa}	8.40 $\pm$ 0.55 ^{Ab}
	FOS	8.14 $\pm$ 0.47 ^{Ba}	9.61 $\pm$ 0.69 ^{Aa}	9.23 $\pm$ 0.62 ^{ABab}
	AL10	2.26 $\pm$ 0.19 ^{Bd}	1.62 $\pm$ 0.28 ^{Cc}	3.11 $\pm$ 0.33 ^{Ad}
	ALA5	8.83 $\pm$ 0.46 ^{Aa}	9.16 $\pm$ 0.71 ^{Aa}	9.83 $\pm$ 0.60 ^{Aa}
	GL10	0.42 $\pm$ 0.15 ^{Ae}	0.43 $\pm$ 0.13 ^{Ad}	0.67 $\pm$ 0.13 ^{Aa}
	GLA5	5.0 $\pm$ 0.32 ^{Ac}	2.33 $\pm$ 0.37 ^{Bb}	4.33 $\pm$ 0.38 ^{Ac}
<i>C. histolyticum</i>	NC	5.71 $\pm$ 0.47 ^{Bc}	9.73 $\pm$ 0.64 ^{Aa}	6.21 $\pm$ 0.29 ^{Bb}
	FOS	9.11 $\pm$ 0.52 ^{Ab}	6.20 $\pm$ 0.51 ^{Bb}	7.66 $\pm$ 0.45 ^{Ca}
	AL10	1.81 $\pm$ 0.14 ^{Ae}	1.92 $\pm$ 0.28 ^{Ac}	1.16 $\pm$ 0.16 ^{Bd}
	ALA5	10.66 $\pm$ 0.98 ^{Aa}	6.16 $\pm$ 0.57 ^{Bb}	3.33 $\pm$ 0.42 ^{Cc}
	GL10	1.89 $\pm$ 0.22 ^{Ae}	1.85 $\pm$ 0.31 ^{Ac}	0.88 $\pm$ 0.16 ^{Bd}
	GLA5	4.60 $\pm$ 0.37 ^{Ad}	5.60 $\pm$ 0.68 ^{Ab}	3.70 $\pm$ 0.27 ^{Bc}
<i>E. rectale</i> / <i>C. coccoides</i>	NC	9.83 $\pm$ 0.47 ^{Aa}	8.96 $\pm$ 0.44 ^{ABb}	8.20 $\pm$ 0.49 ^{Bb}
	FOS	9.60 $\pm$ 0.59 ^{Aa}	7.0 $\pm$ 0.48 ^{Bc}	5.60 $\pm$ 0.32 ^{Cd}
	AL10	1.92 $\pm$ 0.14 ^{Cd}	2.85 $\pm$ 0.26 ^{Bd}	3.89 $\pm$ 0.28 ^{Ae}
	ALA5	5.83 $\pm$ 0.40 ^{Ab}	6.33 $\pm$ 0.35 ^{Ac}	6.66 $\pm$ 0.49 ^{Ac}
	GL10	4.71 $\pm$ 0.52 ^{Ac}	1.47 $\pm$ 0.29 ^{Be}	0.30 $\pm$ 0.11 ^{Ca}
	GLA5	9.33 $\pm$ 0.81 ^{Ba}	12.71 $\pm$ 0.89 ^{Aa}	10.20 $\pm$ 0.76 ^{ABa}

AL10: Acerola + *L. paracasei* L10; ALA5: Acerola + *L. acidophilus* LA-05; GL10: Guava + *L. paracasei* L10; GLA5: Guava + *L. acidophilus* LA-05. A – C: Different superscript capital letters in the same row for the same fermentation medium denote differences ($p \leq 0.05$), based on Tukey's test; a-e: different superscript small letters in the same column at the same time interval and bacterial group denote difference ($p \leq 0.05$), based on Tukey's test.

Table 2. pH values, contents of sugars, lactic acid, and short-chain fatty acids (SCFA) (g/L) in media with fermented acerola and guava fruit by-products (AL10, ALA5, GL10, and GLA5), fructooligosaccharides (FOS), as well as in negative control (NC; without fermentable substrate) at time zero (baseline), 24, and 48 h of *in vitro* fecal fermentation.

Parameters	Samples	Fermentation period		
		0 h	24 h	48 h
pH values	NC	7.07 ± 0.01 ^{Aa}	6.81 ± 0.02 ^{Ba}	5.63 ± 0.02 ^{Ca}
	FOS	7.06 ± 0.01 ^{Aa}	3.56 ± 0.01 ^{Be}	2.60 ± 0.02 ^{Cd}
	AL10	7.00 ± 0.02 ^{Ab}	3.38 ± 0.03 ^{Bf}	3.17 ± 0.01 ^{Cb}
	ALA5	6.96 ± 0.00 ^{Ac}	4.33 ± 0.02 ^{Bc}	3.13 ± 0.00 ^{Cc}
	GL10	6.93 ± 0.01 ^{Ad}	4.24 ± 0.00 ^{Bd}	3.12 ± 0.01 ^{Cc}
	GLA5	6.93 ± 0.01 ^{Ad}	4.99 ± 0.00 ^{Bb}	3.12 ± 0.01 ^{Cc}
<i>Sugars (g/L)</i>				
Glucose	NC	<LOD	<LOD	<LOD
	FOS	8.47 ± 0.03 ^{Aa}	5.31 ± 0.04 ^{Ba}	2.94 ± 0.01 ^{Ca}
	AL10	0.43 ± 0.04 ^{Ac}	<LOD	<LOD
	ALA5	0.31 ± 0.04 ^{Ad}	<LOD	<LOD
	GL10	0.48 ± 0.01 ^{Ab}	<LOD	<LOD
	GLA5	0.47 ± 0.01 ^{Ab}	<LOD	<LOD
Fructose	NC	<LOD	<LOD	<LOD
	FOS	7.28 ± 0.01 ^{Ba}	7.55 ± 0.03 ^{Aa}	3.59 ± 0.04 ^{Ca}
	AL10	0.18 ± 0.01 ^{Ac}	<LOD	<LOD
	ALA5	0.12 ± 0.05 ^{Ad}	<LOD	<LOD
	GL10	0.25 ± 0.04 ^{Ab}	0.07 ± 0.01 ^{Bb}	<LOD
	GLA5	0.24 ± 0.02 ^{Ab}	<LOD	<LOD
Maltose	NC	<LOD	<LOD	<LOD
	FOS	0.16 ± 0.04 ^{Aa}	0.15 ± 0.03 ^{Aa}	0.15 ± 0.01 ^{Aa}
	AL10	0.02 ± 0.01 ^{Ab}	<LOD	<LOD
	ALA5	0.02 ± 0.01 ^{Ab}	<LOD	<LOD
	GL10	<LOD	<LOD	<LOD
	GLA5	<LOD	<LOD	<LOD
Rhamnose	NC	<LOD	<LOD	<LOD
	FOS	<LOD	<LOD	<LOD
	AL10	0.40 ± 0.01 ^{Ac}	0.22 ± 0.04 ^{Ba}	0.17 ± 0.01 ^{Bb}
	ALA5	0.13 ± 0.04 ^{Bd}	<LOD	0.23 ± 0.04 ^{Aa}
	GL10	0.84 ± 0.02 ^{Aa}	0.15 ± 0.03 ^{Cb}	0.28 ± 0.04 ^{Ba}
	GLA5	0.61 ± 0.02 ^{Ab}	0.06 ± 0.01 ^{Cc}	0.16 ± 0.01 ^{Bb}
<i>Acids (g/L)</i>				
Lactic	NC	<LOD	<LOD	<LOD
	FOS	<LOD	5.35 ± 0.05 ^{Ba}	7.83 ± 0.05 ^{Aa}
	AL10	0.13 ± 0.01 ^{Ba}	0.17 ± 0.01 ^{Ad}	<LOD
	ALA5	0.13 ± 0.01 ^{Ba}	0.24 ± 0.02 ^{Ac}	<LOD
	GL10	0.11 ± 0.02 ^{Ba}	0.42 ± 0.04 ^{Ab}	<LOD
	GLA5	<LOD	0.39 ± 0.02 ^{Ab}	<LOD
Acetic	NC	0.22 ± 0.02 ^{Bc}	0.25 ± 0.00 ^{Ac}	0.21 ± 0.00 ^{Bd}
	FOS	0.36 ± 0.03 ^{Ca}	1.59 ± 0.01 ^{Ba}	2.13 ± 0.02 ^{Aa}
	AL10	0.30 ± 0.05 ^{Ca}	0.45 ± 0.06 ^{Bb}	0.58 ± 0.01 ^{Ab}
	ALA5	0.32 ± 0.03 ^{Ba}	0.39 ± 0.05 ^{Bb}	0.49 ± 0.01 ^{Ac}

	GL10	0.34 ± 0.02^{Ca}	0.45 ± 0.01^{Ab}	0.48 ± 0.05^{Bc}
	GLA5	0.26 ± 0.01^{Bb}	0.41 ± 0.01^{Ab}	0.51 ± 0.08^{Ac}
Propionic	NC	1.09 ± 0.00^{Ae}	0.99 ± 0.02^{Ba}	0.40 ± 0.00^{Ca}
	FOS	0.68 ± 0.06^{Af}	0.39 ± 0.00^{Bd}	0.31 ± 0.01^{Cb}
	AL10	1.32 ± 0.02^{Ac}	0.62 ± 0.01^{Bb}	0.34 ± 0.04^{Cb}
	ALA5	1.16 ± 0.02^{Ad}	0.65 ± 0.03^{Bb}	0.41 ± 0.06^{Ca}
	GL10	1.40 ± 0.01^{Ab}	0.61 ± 0.02^{Bb}	0.20 ± 0.01^{Cd}
	GLA5	1.74 ± 0.08^{Aa}	0.56 ± 0.02^{Bc}	0.24 ± 0.00^{Cc}
Butyric	NC	0.23 ± 0.00^{Bc}	0.97 ± 0.01^{Ad}	<LOD
	FOS	0.29 ± 0.01^{Cb}	0.68 ± 0.00^{Be}	0.79 ± 0.00^{Ad}
	AL10	0.23 ± 0.00^{Cc}	1.34 ± 0.01^{Ba}	2.03 ± 0.01^{Ab}
	ALA5	0.28 ± 0.03^{Cb}	1.27 ± 0.00^{Bb}	1.86 ± 0.05^{Ac}
	GL10	0.22 ± 0.02^{Cc}	1.09 ± 0.00^{Bc}	2.11 ± 0.06^{Aa}
	GLA5	0.33 ± 0.01^{Ca}	1.08 ± 0.05^{Bc}	1.77 ± 0.09^{Ac}

AL10: Acerola + *L. paracasei* L10; ALA5: Acerola + *L. acidophilus* LA-05; GL10: Guava + *L. paracasei* L10; GLA5: Guava + *L. acidophilus* LA-05. A–C: Different superscript capital letters in the same row denote differences ($p \leq 0.05$), based on Student's t-test or Tukey's test; a–f: Different superscript small letters in the same column, for the same time interval and measured parameter, denote difference ($p \leq 0.05$), based on Student's t-test or Tukey's test. <LOD: below the limit of detection (LOD was 0.02 g/L for glucose, 0.05 g/L for fructose, 0.02 g/L for lactic acid, 0.007 g/L for malic acid, 0.001 g/L for acetic acid, 0.024 g/L for propionic acid, and 0.02 g/L for butyric acid).

Table 3. Contents of phenolic compounds (mg/L) and antioxidant capacity (%) (average $\pm$ standard deviation; n = 3) in media with fermented acerola and guava fruit by-products (AL10, ALA5, GL10, and GLA5) and fructooligosaccharides (FOS), as well as in negative control (NC; without fermentable substrate) at time zero (baseline), 24, and 48 h of *in vitro* fecal fermentation.

Parameters	Samples	Fermentation period		
		0 h	24 h	48 h
<i>Phenolic acids</i>				
Gallic acid	AL10	<LOD	4.68 ± 0.00 ^{Ad}	3.48 ± 0.02 ^{Bd}
	ALA5	<LOD	5.94 ± 0.01 ^{Ac}	5.19 ± 0.03 ^{Bc}
	GL10	<LOD	7.05 ± 0.01 ^{Ab}	6.83 ± 0.00 ^{Bb}
	GLA5	<LOD	9.69 ± 0.04 ^{Aa}	8.95 ± 0.03 ^{Ba}
Syringic acid	AL10	<LOD	<LOD	<LOD
	ALA5	<LOD	3.58 ± 0.01 ^{Aa}	<LOD
	GL10	<LOD	<LOD	<LOD
	GLA5	<LOD	<LOD	<LOD
<i>Flavanols</i>				
Procyanidin A2	AL10	8.21 ± 0.02 ^{Ab}	1.44 ± 0.01 ^{Bc}	1.07 ± 0.01 ^{Cc}
	ALA5	7.09 ± 0.01 ^{Ad}	1.92 ± 0.01 ^{Ba}	1.31 ± 0.05 ^{Ca}
	GL10	7.44 ± 0.00 ^{Ac}	1.21 ± 0.01 ^{Bd}	1.03 ± 0.03 ^{Cc}
	GLA5	9.16 ± 0.01 ^{Aa}	1.57 ± 0.02 ^{Bb}	1.18 ± 0.01 ^{Cb}
Procyanidin B1	AL10	1.46 ± 0.01 ^{Ad}	<LOD	<LOD
	ALA5	2.25 ± 0.02 ^{Ac}	<LOD	<LOD
	GL10	7.85 ± 0.04 ^{Aa}	2.71 ± 0.01 ^{Bc}	<LOD
	GLA5	7.41 ± 0.03 ^{Ab}	3.11 ± 0.04 ^{Bb}	<LOD
Procyanidin B2	AL10	9.88 ± 0.01 ^{Ad}	1.25 ± 0.03 ^{Bd}	<LOD
	ALA5	13.23 ± 0.05 ^{Ab}	2.33 ± 0.03 ^{Bc}	1.47 ± 0.02 ^{Cc}
	GL10	11.51 ± 0.01 ^{Ac}	9.76 ± 0.08 ^{Bb}	9.43 ± 0.10 ^{Ca}
	GLA5	15.69 ± 0.02 ^{Aa}	11.58 ± 0.05 ^{Ba}	6.59 ± 0.05 ^{Cb}
Catechin	AL10	<LOD	<LOD	<LOD
	ALA5	<LOD	6.61 ± 0.03 ^{Aa}	1.03 ± 0.02 ^{Ba}
	GL10	<LOD	<LOD	<LOD
	GLA5	<LOD	<LOD	<LOD
Epigallocatechin gallate	AL10	2.32 ± 0.02 ^{Cc}	6.58 ± 0.01 ^{Ba}	7.20 ± 0.03 ^{Aa}
	ALA5	5.38 ± 0.05 ^{Ba}	5.43 ± 0.06 ^{Bb}	5.83 ± 0.03 ^{Ab}
	GL10	1.69 ± 0.01 ^{Cd}	4.44 ± 0.03 ^{Bd}	4.84 ± 0.01 ^{Ac}
	GLA5	3.37 ± 0.01 ^{Bb}	4.71 ± 0.06 ^{Ac}	4.78 ± 0.05 ^{Ad}
Epicatechin	AL10	<LOD	3.21 ± 0.01 ^{Aa}	<LOD
	ALA5	1.25 ± 0.02 ^{Aa}	<LOD	<LOD
	GL10	<LOD	<LOD	<LOD
	GLA5	<LOD	<LOD	<LOD
<i>Flavonols</i>				
Quercetin 3-Glucoside	AL10	<LOD	<LOD	<LOD
	ALA5	1.28 ± 0.03 ^{Aa}	1.20 ± 0.01 ^{Ba}	<LOD
	GL10	<LOD	<LOD	<LOD
	GLA5	<LOD	<LOD	<LOD
Isorhamnetin	AL10	5.64 ± 0.05 ^{Aa}	<LOD	<LOD
	ALA5	5.71 ± 0.03 ^{Aa}	<LOD	<LOD
	GL10	<LOD	<LOD	<LOD
	GLA5	<LOD	<LOD	<LOD

<i>Antioxidant activity</i>				
DPPH [•] (μmol TEAC/g) ¹	AL10	14.19 ± 0.52 ^{Ab}	13.51 ± 0.20 ^{Bb}	14.10 ± 0.52 ^{Ab}
	ALA5	8.29 ± 0.43 ^{Bd}	5.70 ± 0.16 ^{Cd}	9.87 ± 0.41 ^{Ad}
	GL10	10.59 ± 0.25 ^{Ac}	9.14 ± 0.32 ^{Bc}	10.77 ± 0.11 ^{Ac}
	GLA5	15.47 ± 0.26 ^{Aa}	14.50 ± 0.21 ^{Ba}	15.51 ± 0.28 ^{Aa}
ABTS ^{•+} (μmol TEAC/g) ¹	AL10	16.89 ± 0.18 ^{Bd}	19.97 ± 0.46 ^{Ac}	22.08 ± 0.35 ^{Ab}
	ALA5	20.96 ± 0.49 ^{Bb}	18.24 ± 0.37 ^{Cd}	28.79 ± 0.22 ^{Aa}
	GL10	18.50 ± 0.51 ^{Cc}	21.05 ± 0.26 ^{Ab}	19.43 ± 0.28 ^{Bc}
	GLA5	23.94 ± 0.22 ^{Ca}	24.69 ± 0.33 ^{Ba}	28.50 ± 0.15 ^{Aa}
FRAP (μmol FeSO ₄ /g)	AL10	13.60 ± 0.36 ^{Ad}	11.60 ± 0.19 ^{Bc}	13.40 ± 0.20 ^{Ad}
	ALA5	19.70 ± 0.44 ^{Cb}	28.40 ± 0.27 ^{Aa}	24.30 ± 0.61 ^{Ba}
	GL10	18.50 ± 0.15 ^{Bc}	20.70 ± 0.18 ^{Ab}	15.30 ± 0.52 ^{Cc}
	GLA5	27.70 ± 0.23 ^{Ba}	28.40 ± 0.15 ^{Aa}	19.80 ± 0.45 ^{Cb}

AL10: Acerola + *L. paracasei* L10; ALA5: Acerola + *L. acidophilus* LA-05; GL10: Guava + *L. paracasei* L10; GLA5: Guava + *L. acidophilus* LA-05. A–C: Different superscript capital letters in the same row denote differences ($p \leq 0.05$), based on Student's t-test or Tukey's test; a–d: Different superscript small letters in the same column, for the same time interval and measured parameter, denote difference ($p \leq 0.05$), based on Student's t-test or Tukey's test.

¹The results are expressed as micromoles of Trolox equivalent antioxidant capacity (TEAC) per gram of sample (μmol TEAC/g). Abbreviations: ABTS^{•+} cation - 2,2-azino-bis (3-ethylbenzo-tiazoline)-6-sulfonic acid; DPPH[•] cation - 2,2- diphenyl-1-picrylhydrazyl; FRAP - ferric reducing antioxidant power. <LOD: below the limit of detection.

Table S1. Physicochemical parameters of freeze-dried fruit processing co-products used in assays to evaluate potential prebiotic properties (Araújo et al., 2020).

Parameters	Fruit processing by-products	
	Acerola	Guava
Fructose	8.48 ± 0.01 ^A	3.92 ± 0.01 ^B
Glucose	5.31 ± 0.01 ^A	3.17 ± 0.01 ^B
Maltose	1.52 ± 0.01 ^A	1.53 ± 0.01 ^A
Soluble fiber	8.09 ± 0.69 ^B	33.44 ± 3.63
Insoluble fiber	61.16 ± 1.75 ^A	49.12 ± 1.58 ^B
Total dietary fiber	69.25 ± 1.06 ^B	82.55 ± 2.05 ^A
Total flavonoids (mg EC/100 g) ¹	79.83 ± 0.23 ^A	44.09 ± 1.01 ^B
Total phenolics (mg EAG/100 g) ²	492.107 ± 0.54 ^A	304.057 ± 0.94 ^B

A-B: Different superscript capital letters in the same row denote difference ($p \leq 0.05$), based on Tukey's test, among co-products, based on Student's t-test. ¹The results are expressed in milligram equivalents of catechin (EC) per hundred grams of sample (mg EC/100 g). ²The results are expressed in milligram equivalents of gallic acid (EAG) per hundred grams of sample (mg EAG/100 g).

Table S2. Identification of metabolites by ^1H -NMR in media with fermented acerola and guava fruit co-products (AL10, ALA5, GL10, and GLA5) and fructooligosaccharides (FOS), as well as in negative control (NC; without fermentable substrate) at time zero (baseline), and 48 h of *in vitro* fecal fermentation.

Number	Chemical constituents	NC		FOS		ALA5		AL10		GLA5		GL10	
		0 h	48 h	0 h	48 h	0 h	48 h	0 h	48 h	0 h	48 h	0 h	48 h
1	Biliary salts	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x
2	2-methylbutyrate	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x
3	Valerate	x	x	x	x	x		x	x	x	x	x	x
4	N-butyrate	x	x	x	x	x		x	x	x	x	x	x
5	Leucine	x		x	x	x		x		x		x	
6	Isoleucine	x		x	x	x		x		x		x	
7	Valine	x		x	x	x		x		x		x	
8	Propionate/ propionic acid	x		x	x	x		x		x		x	
9	Isobutyrate/ butyric acid	x		x	x	x		x		x		x	
10	3-methyl-2-oxoisovalerate	x		x	x	x	x	x	x	x	x	x	
11	2-oxoisovalerate	x		x	x	x	x	x	x	x	x	x	
12	Ethanol	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x
13	3-hydroxybutyrate	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x
14	Threonine						x		x		x		x
15	Lactate/lactic acid	x	x	x	x	x	x	x		x		x	
16	Alanine	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x
17	Lysine	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x
18	Ornithine	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x
19	Acetate/acetic acid	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x
20	Proline	x	x	x		x	x	x	x	x	x	x	x
21	Glutamate	x	x	x		x	x	x	x	x	x	x	x
22	5-aminopentanoate	x		x		x	x	x	x	x	x	x	x

23	Succinate/succinic acid	x			x	x	x	x	x	x	x	x	x
24	Methylamine	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x
25	Methionine	x		x		x	x	x		x		x	x
26	Citrate/citric acid	x		x		x	x	x		x		x	x
27	Aspartate	x		x				x		x		x	x
28	Asparagine	x	x	x	x	x		x		x		x	x
29	Trimethylamine	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	
30	Putrescine	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x
31	Malonate	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x
32	Glycine	x	x		x								
33	Fructose	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x
34	Dihydroxyacetone	x	x	x	x	x	x						
35	α -Xylose	x				x	x	x	x	x	x	x	x
36	β -Xylose	x				x	x	x		x		x	
37	β -Glucose	x				x	x	x		x		x	
38	α -Glucose	x				x		x		x		x	
39	β -galactose	x				x	x	x		x		x	
40	UDP-glucuronate	x	x	x		x		x		x	x	x	x
41	Homovanillate	x		x	x	x	x	x	x	x	x	x	x
42	3-hydroxyphenylacetate							x		x		x	
43	P-cresol	x	x	x		x	x	x	x	x	x	x	x
44	Tyrosine	x	x	x		x	x	x	x	x	x	x	x
45	5-aminosalicylate	x		x		x	x	x	x	x	x	x	x
46	Phenylalanine	xx	x	x		x	x	x	x	x	x	x	x
47	Uracil	x	x	x		x	x	x	x	x	x	x	x
48	N-acetyl-5-aminosalicylate	x	x	x		x	x	x		x		x	
49	Phenylacetate	x	x	x		x	x	x		x		x	
50	Tryptophan	x						x		x		x	

51	Hypoxanthine	x		x		x		x		x		x	
52	Formate/formic acid	x	x	x		x	x	x	x	x	x	x	x
53	Caprylate	x		x	x	x	x	x	x	x	x	x	x
54	Isocaproate	x	x	x		x	x	x	x	x	x	x	x
55	Isovalerate	x		x	x	x	x	x	x	x	x	x	x
56	3-hydroxyisovalerate						x		x		x		x
57	Total lipids	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x
58	Gamma-aminobutyric acid (GABA)	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x
59	Ketoisovalerate	x		x	x	x	x	x	x	x	x		x
60	Acetone	x		x		x	x	x	x	x	x	x	x

ANEXO A - CERTIDÃO DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA

CENTRO DE CIÊNCIAS DA
SAÚDE DA UNIVERSIDADE
FEDERAL DA PARAÍBA -
CCS/UFPB



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: POTENCIAL DE COPRODUTOS DE FRUTAS NA ESTABILIZAÇÃO DE CEPAS PROBIÓTICAS DE *Lactobacillus* DURANTE A LIOFILIZAÇÃO, ARMAZENAMENTO, PASSAGEM PELO TRATO GASTROINTESTINAL E EFEITOS SOBRE A MICROBIOTA INTESTINAL

Pesquisador: MARIA ELIEIDY GOMES DE OLIVEIRA

Área Temática:

Versão: 1

CAAE: 69076323.6.0000.5188

Instituição Proponente: Centro De Ciências da Saúde

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 6.080.926

Apresentação do Projeto:

A busca por alimentos funcionais vem aumentando em todo o mundo em virtude dos seus benefícios sobre a saúde dos consumidores. As frutas são amplamente conhecidas pelo seu potencial funcional, e recentemente, os coprodutos de frutas tem ganhado um destaque especial devido ao seu conteúdo nutricional quando comparado com a porção comestível da fruta. Esses coprodutos derivados do processamento de frutas são constituídos de cascas, sementes, bagaço e talos que geralmente são utilizados como ração animal e o excedente é descartado em aterros sanitários, acarretando, assim, impactos ambientais negativos

(ARAÚJO et al., 2014; ASYIFAH et al., 2014; QUINTANA et al., 2017). O subproduto do caju foi usado para suplementar meios de cultivo contendo probióticos, como fonte de carbono para cepas de *Lactobacillus* (DUARTE et al., 2017). As culturas de bactérias ácido lácticas (BAL), dentre elas as probióticas, são comumente utilizadas como culturas iniciadoras pela indústria para o processamento de alimentos e/ou formulação de alimentos funcionais (CHENG et al., 2022).

Objetivo da Pesquisa:

Objetivo Primário: Avaliar o potencial de coprodutos do processamento de frutas (acerola, caju e goiaba) como meio de cultivo capaz de estabilizar cepas probióticas de *Lactobacillus*, durante os processos de desidratação (liofilização), armazenamento, passagem pelo trato gastrointestinal

Endereço: Prédio do CCS UFPB - 1º Andar

Bairro: Cidade Universitária

CEP: 58.051-900

UF: PB

Município: JOÃO PESSOA

Telefone: (83)3216-7791

Fax: (83)3216-7791

E-mail: comitedetica@cca.ufpb.br

**CENTRO DE CIÊNCIAS DA
SAÚDE DA UNIVERSIDADE
FEDERAL DA PARAÍBA -
CCS/UFPB**



Continuação do Parecer: 6.083.926

simulado e efeitos sobre a microbiota Intestinal de indivíduos saudáveis. Objetivo Secundário: Caracterizar os parâmetros físicos e físico-químicos dos coprodutos gerados a partir do processamento de frutas após processo de secagem; Utilizar os coprodutos de frutas como meio de cultivo para o crescimento de cepas de *Lactobacillus* probióticas, verificando o efeito estimulador seletivo dos coprodutos sobre o crescimento das culturas; Avaliar a capacidade estabilizadora exercida pelos diferentes coprodutos de frutas sobre as cepas de probióticos quando expostas ao processo de liofilização, armazenamento e exposição às condições simuladas do trato gastrointestinal; Avaliar in vitro os efeitos exercidos pelos coprodutos de frutas sobre a composição e atividade metabólica da microbiota Intestinal colônica humana.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Os riscos e benefícios aos participantes da pesquisa foram considerados pela pesquisadora.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Estudo de Interesse científico e de possível aplicação na produção de alimentos industrializados.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Os termos estão em conformidade com as recomendações deste CEP.

Recomendações:

Na metodologia:

Definir o local onde as análises serão realizadas;

Descrever qual o procedimento de seleção de voluntários participantes para a pesquisa;

Sobre os critérios de inclusão, descrever "indivíduos adultos saudáveis";

Sobre os critérios de exclusão, acrescentar "não aceitarem participar como doador de material biológico";

Sobre os riscos, excluir a expressão "não oferece riscos". Neste estudo em particular existem riscos potenciais e previsíveis: constrangimento para o procedimento de amostras fecais, e de recontaminação de coliformes fecais por manipulação inadequada de material fecal.

Sobre os benefícios, deixar quais benefícios diretos aos participantes da pesquisa.

Inserir no cronograma a atividade de "coleta de material biológico";

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Sugerimos a aprovação do projeto de pesquisa.

Endereço: Prédio do CCS UFPB - 1º Andar

Bairro: Cidade Universitária

CEP: 58.051-900

UF: PB

Município: JOÃO PESSOA

Telefone: (83)3216-7791

Fax: (83)3216-7791

E-mail: comitedeetica@ccs.ufpb.br

**CENTRO DE CIÊNCIAS DA
SAÚDE DA UNIVERSIDADE
FEDERAL DA PARAÍBA -
CCS/UFPB**



Continuação do Parecer: 5.090.925

Considerações Finais a critério do CEP:

Certifico que o Comitê de Ética em Pesquisa do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal da Paraíba – CEP/CCS aprovou a execução do referido projeto de pesquisa. Outrossim, Informo que a autorização para posterior publicação fica condicionada à submissão do Relatório Final na Plataforma Brasil, via Notificação, para fins de apreciação e aprovação por este egrégio Comitê.

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_2127071.pdf	25/04/2023 12:31:57		Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	Projeto_detalhado.pdf	25/04/2023 12:19:59	MARIA ELIEIDY GOMES DE OLIVEIRA	Aceito
Declaração de concordância	Termo_de_compromisso_de_divulgacao_dos_resultados.pdf	25/04/2023 12:17:49	MARIA ELIEIDY GOMES DE OLIVEIRA	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE.pdf	25/04/2023 12:16:21	MARIA ELIEIDY GOMES DE OLIVEIRA	Aceito
Outros	Certidao_de_aprovacao_projeto.pdf	25/04/2023 12:15:51	MARIA ELIEIDY GOMES DE OLIVEIRA	Aceito
Orçamento	ORCAMENTO.pdf	25/04/2023 12:15:15	MARIA ELIEIDY GOMES DE OLIVEIRA	Aceito
Declaração de Pesquisadores	Termo_de_compromisso_dos_pesquisadores.pdf	25/04/2023 12:13:20	MARIA ELIEIDY GOMES DE OLIVEIRA	Aceito
Declaração de Instituição e Infraestrutura	Cartas_de_Anuencias.pdf	25/04/2023 12:11:36	MARIA ELIEIDY GOMES DE OLIVEIRA	Aceito
Cronograma	CRONOGRAMA.pdf	25/04/2023 12:11:10	MARIA ELIEIDY GOMES DE OLIVEIRA	Aceito
Folha de Rosto	FolhaDeRostoAssinada.pdf	25/04/2023 12:10:06	MARIA ELIEIDY GOMES DE OLIVEIRA	Aceito

Endereço: Prédio da CCS UFPB - 1º Andar

Bairro: Cidade Universitária

CEP: 58.051-000

UF: PB

Município: JOÃO PESSOA

Telefone: (83)3216-7791

Fax: (83)3216-7791

E-mail: comitedeetica@ccs.ufpb.br

**CENTRO DE CIÊNCIAS DA
SAÚDE DA UNIVERSIDADE
FEDERAL DA PARAÍBA -
CCS/UFPB**



Continuação do Parecer: 6.080.925

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

JOAO PESSOA, 25 de Maio de 2023

Assinado por:

Ellane Marques Duarte de Sousa
(Coordenador(a))

Endereço: Prédio do CCS UFPB - 1º Andar

Bairro: Cidade Universitária

CEP: 58.051-900

UF: PB

Município: JOAO PESSOA

Telefone: (83)3216-7791

Fax: (83)3216-7791

E-mail: comitedeetica@cca.ufpb.br