

**ANÁLISE BROMATOLÓGICA E AVALIAÇÃO DAS PROPRIEDADES ANTIOXIDANTES DO SUCO PASTEURIZADO DE CUPUAÇU (*Theobroma grandiflorum*) FERMENTADO POR *Lactocaseibacillus rhamnosus* ATCC 9595**

Daniel dos Santos Guimarães<sup>1</sup>; Camila Caetano da Silva <sup>2</sup>

Kátia Sayuri Aragão Aguiar<sup>3</sup>; Alexia Figueiredo Ferreira<sup>4</sup>; Marcos Andrade Silva<sup>5</sup>

Luís Cláudio Nascimento da Silva<sup>6</sup>; Adrielle Zagnignan<sup>7</sup>

**Destaques:** (1) A fermentação por *L. rhamnosus* ATCC 9595 aumentou a capacidade antioxidante do suco de cupuaçu. (2) O suco atendeu aos padrões microbiológicos, com *L. rhamnosus* mantendo-se estável por 28 dias. (3) Suco fermentado manteve a atividade antioxidante durante o armazenamento por 28 dias.

PRE-PROOF

(as accepted)

Esta é uma versão preliminar e não editada de um manuscrito que foi aceito para publicação na Revista Contexto & Saúde. Como um serviço aos nossos leitores, estamos disponibilizando esta versão inicial do manuscrito, conforme aceita. O artigo ainda passará por revisão, formatação e aprovação pelos autores antes de ser publicado em sua forma final.

<http://dx.doi.org/10.21527/2176-7114.2024.48.15050>

Como citar:

Guimarães D dos S, da Silva CC, Aguiar KSA, Ferreira AF, Silva MA. et al. Análise bromatológica e avaliação das propriedades antioxidantes do suco pasteurizado de cupuaçu (*Theobroma grandiflorum*) fermentado por *Lactocaseibacillus rhamnosus* ATCC 9595. Rev. Contexto & Saúde, 2024;24(48): e15050

---

<sup>1</sup> Universidade Ceuma. São Luís/MA, Brasil. <https://orcid.org/0009-0007-6699-596X>

<sup>2</sup> Universidade Ceuma. São Luís/MA, Brasil. <https://orcid.org/0009-0003-2830-7821>

<sup>3</sup> Universidade Ceuma. São Luís/MA, Brasil. <https://orcid.org/0009-0000-1550-2132>

<sup>4</sup> Universidade Ceuma. São Luís/MA, Brasil. <https://orcid.org/0009-0000-1550-2132>

<sup>5</sup> Universidade Ceuma. São Luís/MA, Brasil. <https://orcid.org/0000-0001-6558-2863>

<sup>6</sup> Universidade Ceuma. São Luís/MA, Brasil. <https://orcid.org/0000-0002-4206-0904>

<sup>7</sup> Universidade Ceuma. São Luís/MA, Brasil. <https://orcid.org/0000-0001-9865-2223>

**ANÁLISE BROMATOLÓGICA E AVALIAÇÃO DAS PROPRIEDADES ANTIOXIDANTES  
DO SUCO PASTEURIZADO DE CUPUAÇU (*Theobroma grandiflorum*)  
FERMENTADO POR *Lactocaseibacillus rhamnosus* ATCC 9595**

## **RESUMO**

O presente trabalho realizou a análise bromatológica e avaliou as propriedades antioxidantes do suco pasteurizado de cupuaçu (*Theobroma grandiflorum*) fermentado por *Lactocaseibacillus rhamnosus* ATCC 9595. Os sucos foram pasteurizados (80 °C/10 minutos), para posterior fermentação com *L. rhamnosus* ATCC 9595 (inóculo de 10<sup>8</sup> UFC). Após 48h, foi analisado a viabilidade de *L. rhamnosus*, produção de ácidos orgânicos e resistência à lisozima e sais biliares. As amostras foram mantidas sob refrigeração durante 28 dias para análises bromatológicas. Os sucos foram submetidos à extração com acetato de etila para avaliação da atividade antioxidante, dosagem de compostos fenólicos e flavonoides. *L. rhamnosus* ATCC 9595 cresceu no suco pasteurizado de cupuaçu (~9 Log UFC/mL), se mantendo estável durante os 28 dias (p>0,05). Todas as amostras estavam nos padrões microbiológicos estabelecidos pelas diretrizes brasileiras para sucos. De igual modo, não foram detectadas alterações significativas nos teores de Cinzas, umidade e B° nos períodos analisados (p>0,05). *L. rhamnosus* ATCC 9595 cultivado no suco ou MRS resistiu a ação da lisozima (100 mg/L) e sais biliares (0,5% e 1,0%). A capacidade antioxidante do suco de cupuaçu aumentou significativamente após a fermentação por *L. rhamnosus* ATCC 9595 e os teores de compostos fenólicos. As amostras de suco fermentados apresentaram valores de IC50 semelhantes durante o armazenamento, enquanto o extrato não fermentado apresentou variação a partir do 21º dia. Os resultados que a fermentação por *L. rhamnosus* ATCC 9595 é uma estratégia eficiente para aumentar as características antioxidantes do suco de cupuaçu.

**Palavras-chave:** Fermentação, Suco de Fruta, Probióticos, Alimento Funcional, Radicais Livres.

## **1. INTRODUÇÃO**

Os radicais livres e espécies reativas de oxigênio (ERO) possuem papéis importantes na etiologia de patologias degenerativas (Mal de Parkinson, Doença de Alzheimer), câncer, diabetes, e desordens inflamatórias <sup>1</sup>. Neste sentido, os organismos desenvolveram diversas estratégias visando o controle destes agentes que, em conjunto, compõe o sistema de defesa antioxidante formado por enzimas (como a superóxido dismutase e catalase) e proteínas (glutathione, tioredoxina) <sup>2</sup>. No entanto, em muitas situações este sistema não consegue lidar

ANÁLISE BROMATOLÓGICA E AVALIAÇÃO DAS PROPRIEDADES ANTIOXIDANTES  
DO SUCO PASTEURIZADO DE CUPUAÇU (*Theobroma grandiflorum*)  
FERMENTADO POR *Lacticaseibacillus rhamnosus* ATCC 9595

com a superprodução de espécies reativas, gerando um estado denominado de estresse oxidativo, estando este, relacionado com as manifestações clínicas acima descritas<sup>3,4</sup>.

Uma forma alternativa de retardar os danos causados pelos radicais livres é uso de alimentos com propriedades antioxidantes que agem por diferentes mecanismos<sup>1,5</sup>. As frutas são reconhecidas como excelentes fontes de compostos bioativos (como proteínas, vitaminas, carboidratos solúveis, flavonoides e outros compostos fenólicos)<sup>6</sup>. Por exemplo, o suco e a polpa de cupuaçu (*Theobroma grandiflorum*) possuem compostos com propriedades antioxidantes, anti-inflamatórios, hipoglicemiante<sup>7-9</sup>.

Recentemente, foi relatado o desenvolvimento de um suco de cupuaçu potencialmente probiótico baseada na incorporação de *Lacticaseibacillus rhamnosus* ATCC 9595 (= *Lactobacillus rhamnosus*)<sup>9</sup>. Esta linhagem foi selecionada devido às suas propriedades antimicrobianas e imunomoduladoras<sup>10,11</sup>. A fermentação do suco de cupuaçu com *L. rhamnosus* ATCC 9595 causou alterações no perfil metabólito do suco de cupuaçu devido à biotransformação e aumento na concentração de alguns compostos bioativos<sup>9</sup>.

Adicionalmente, a fermentação por *L. rhamnosus* ATCC 9595 promoveu o aumento das propriedades anti-inflamatórias observadas em modelos murinos de endotoxemia induzida por lipopolissacarídeo<sup>9</sup>. A fermentação com *L. rhamnosus* ATCC 9595 também foi empregada para a melhoria das características funcionais do suco de bacuri. O suco de bacuri (*Platonia insignis*) fermentado apresentou efeitos anti-infecciosos superiores aos observados para o suco não fermentado, prolongando a sobrevivência de larvas de *Tenebrio molitor* infectadas por uma linhagem de *Escherichia coli* enteroagregativa<sup>12</sup>.

Diante do potencial biotecnológico de *L. rhamnosus* ATCC 9595 para produção de bebidas potencialmente probiótica, o presente trabalho realizou a análise bromatológica e avaliou as propriedades antioxidantes do suco pasteurizado de cupuaçu fermentado por *L. rhamnosus* ATCC 9595 armazenado por 28 dias.

**ANÁLISE BROMATOLÓGICA E AVALIAÇÃO DAS PROPRIEDADES ANTIOXIDANTES  
DO SUCO PASTEURIZADO DE CUPUAÇU (*Theobroma grandiflorum*)  
FERMENTADO POR *Lacticaseibacillus rhamnosus* ATCC 9595**

## **2. MATERIAIS E MÉTODOS**

### **2.1. Preparo dos sucos pasteurizados e fermentação com *Lacticaseibacillus rhamnosus* ATCC 9595**

Os frutos do Cupuaçu foram obtidos em São Luís (Maranhão, Brasil). A polpa dos frutos foi retirada manualmente e armazenada -20 °C até o seu preparo. Em cada experimento, amostras (30 g) de polpa foram dissolvidas em 250 mL de água destilada (120 mg/mL) e o pH ajustado para 6,0. Em seguida, cada suco foi submetido à pasteurização (80 °C por 10 min). O suco foi transferido para recipiente com gelo, até atingir a temperatura ambiente, e posteriormente 1 mL de suspensão de *L. rhamnosus* ATCC 9595 (10<sup>8</sup> UFC/mL) foi adicionado. As culturas foram incubadas sob agitação (120 rpm). Após 48 h, as amostras foram diluídas em série utilizando solução salina tamponada com fosfato (PBS) e plaqueadas em Ágar MRS. As placas foram então incubadas a 37 °C por 48 horas, e as unidades formadoras de colônias (UFC) foram expressas em UFC/mL<sup>9</sup>.

### **2.2. Avaliação da estabilidade dos sucos durante armazenamento**

#### **2.2.1. Viabilidade de *Lacticaseibacillus rhamnosus* ATCC 9595 no suco pasteurizado de Cupuaçu**

Amostras dos sucos fermentados e não fermentados foram armazenados a 8 °C. Após cada período determinado (7, 14, 21 e 28 dias de refrigeração), a viabilidade de *L. rhamnosus* ATCC 9595 foi analisada conforme descrito acima.

#### **2.2.2. Análise microbiológicas e físico-química**

A pesquisa de microrganismos patogênicos nos sucos armazenados foi realizada segundo a instrução normativa N° 60 de 2019<sup>13</sup>. Durante o período de armazenamento foram analisadas possíveis variações na cor, cinzas totais, umidade e teores de açúcar<sup>14</sup>. Cinco amostras por lote fabricado foram utilizadas para cada análise.

**ANÁLISE BROMATOLÓGICA E AVALIAÇÃO DAS PROPRIEDADES ANTIOXIDANTES  
DO SUCO PASTEURIZADO DE CUPUAÇU (*Theobroma grandiflorum*)  
FERMENTADO POR *Lacticaseibacillus rhamnosus* ATCC 9595**

**2.3. Simulação *in vitro* do trato gastrointestinal do *Lacticaseibacillus rhamnosus* ATCC 9595 no suco de Cupuaçu**

**2.3.1. Resistência à lisozima**

Inicialmente, os microrganismos crescidos em 10 mL de caldo MRS a 37 °C foram centrifugados, lavados duas vezes e suspensos em 2 mL com tampão fosfato (0,1 M, pH 7,0). Em seguida, 10% da suspensão bacteriana foi inoculada em uma solução eletrolítica estéril (SEE) (0,22 g/L CaCl<sub>2</sub>, 6,2 g/L NaCl, 2,2 g/L KCl, 1,2 g/L NaHCO<sub>3</sub>) na presença de 100 mg/L de lisozima (Sigma-Aldrich, St. Louis, EUA). Para controle, a suspensão bacteriana também foi inoculada em SEE sem lisozima. A taxa de sobrevivência foi expressa como porcentagem de UFC/mL após 30 min e 120 min comparando com a contagem determinada no tempo zero.

**2.3.2. Teste de tolerância aos sais biliares**

O teste de tolerância aos sais biliares foi realizado conforme método previamente descrito, com modificações<sup>15</sup>. As soluções de meio MRS e suco não fermentado estéril, foram preparadas contendo sais biliares (Oxgall Sigma, EUA) a 0,5% ou 1,0% e pH 7,3. Numa placa de 96 poços foram adicionados 100 µL de cada solução e subsequentemente 10 µL do suco fermentado. A placa foi incubada por 3 horas a 37 °C e os resultados foram lidos no dispositivo espectrofotômetro de 630 nm.

**2.4. Ensaios antioxidantes *in vitro* do suco de cupuaçu**

Amostras (100 mL) dos sucos fermentados e não fermentados foram submetidas à extração líquido-líquido utilizando acetato de etila (1:1; v/v). Após separação, o solvente foi removido por evaporação e os extratos foram armazenados a -20 °C.

**2.4.1. Ensaios de DPPH e ABTS**

As propriedades sequestradoras de radicais livres dos extratos foram mensuradas usando o radical DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazil; Sigma-Aldrich) e usando o radical ABTS (2,2'-azino-bis-(3-etilbenzotiazolona-6-ácido sulfônico), conforme métodos previamente descritos<sup>16</sup>.

**ANÁLISE BROMATOLÓGICA E AVALIAÇÃO DAS PROPRIEDADES ANTIOXIDANTES  
DO SUCO PASTEURIZADO DE CUPUAÇU (*Theobroma grandiflorum*)  
FERMENTADO POR *Lactocaseibacillus rhamnosus* ATCC 9595**

#### **2.4.2. Dosagem de compostos fenólicos**

A dosagem de compostos fenólicos presente nos extratos foi realizada utilizando o reagente Folin-Ciocalteu. Amostras (200 µL a 1000 µg/mL) foram adicionadas a 1,0 mL de reagente de Folin-Ciocalteu (1: 1 v/v). Após 3 minutos, foram adicionados 800 µL de carbonato de sódio (20%). A mistura foi incubada à temperatura ambiente, ao abrigo da luz e em repouso durante 2 horas. A absorbância da mistura foi medida a 765 nm. O conteúdo de fenóis totais foi expresso em µg/mL de equivalentes de ácido gálico (EAG), utilizando uma curva de calibração obtida com a solução padrão de ácido gálico <sup>16</sup>.

#### **2.5. Dosagem de Flavonoides**

Alíquotas das amostras (100 µL em diferentes concentrações) foram misturadas com 100 µL da solução reagente (2 g de Cloreto de Alumínio diluído em solução de etanol a 2%). A mistura foi incubada à temperatura ambiente e ao abrigo de luz e após 60 min a absorbância foi medida a 420 nm. A quantidade de flavonoides calculou-se em µg/mL de Equivalente de quercetina (EQ), utilizando uma curva de calibração construída com solução padrão de quercetina <sup>16</sup>.

#### **2.6. Análise de dados**

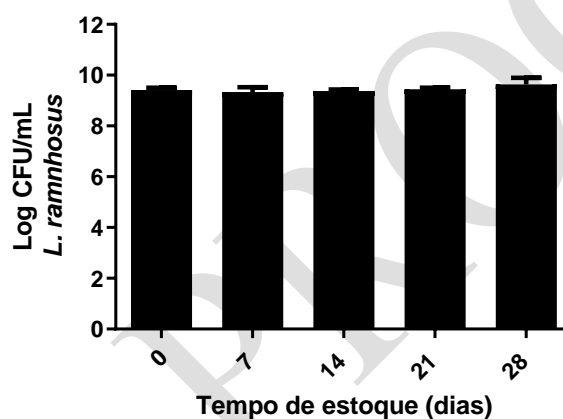
Os experimentos foram realizados em triplicata e em três ensaios independentes. Foi utilizado o Excel® para tabulação dos dados e o GraphPad Prism versão 8.1 para análise dos dados usando os testes t de Student ou Análise de variância de uma via (*One-way-ANOVA*) ou de duas vias (*Two-way-ANOVA*), dependendo do tipo de experimento. Todos os resultados estão expressos em valores médios dos grupos e analisados considerando o valor de  $p < 0,05$  como estatisticamente significativo.

ANÁLISE BROMATOLÓGICA E AVALIAÇÃO DAS PROPRIEDADES ANTIOXIDANTES  
DO SUCO PASTEURIZADO DE CUPUAÇU (*Theobroma grandiflorum*)  
FERMENTADO POR *Lacticaseibacillus rhamnosus* ATCC 9595

### 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

#### 3.1. Viabilidade de *Lacticaseibacillus rhamnosus* ATCC 9595 no suco pasteurizado de cupuaçu durante o armazenamento

Inicialmente foi analisado o crescimento de *L. rhamnosus* ATCC 9595 no suco pasteurizado de cupuaçu, sendo obtida uma população de aproximadamente 9 Log UFC/mL, que se manteve estável durante os 28 dias de armazenamento ( $p>0,05$ ) (figura 1). O pH do suco após a fermentação foi de  $4,2 \pm 0,03$ , indicando a produção de ácidos orgânicos. Estes dados estão em consonância com os obtidos na fermentação do suco de cupuaçu esterilizado por autoclavagem<sup>9</sup>.



**Figura 1:** Armazenamento por 28 dias do *Lacticaseibacillus rhamnosus* ATCC 9595 em suco pasteurizado de *Theobroma grandiflorum*.  $p>0,05$ . Valores analisados pelo teste *One-way-ANOVA*.

A utilização de probióticos em produtos alimentícios no Brasil requer uma análise prévia da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), que preconiza que a população de probióticos deve estar situada na faixa de 8 e 9 Log UFC/mL no produto pronto para o consumo<sup>17-19</sup>. Neste contexto, o produto formulado nesta pesquisa atende a concentração de probióticos exigida pela ANVISA. Em adição, foi confirmado que o suco de cupuaçu é uma matriz adequada para propagação de bactérias probióticas, como demonstrado anteriormente<sup>9</sup>.

Apesar de ser mais frequentemente associada ao leite, a fermentação láctica pode ser realizada utilizando matrizes vegetais, como polpas e leites de frutas, desde que contenham açúcares fermentáveis em suas composições<sup>20</sup>. A incorporação de probióticos em bebidas de

**ANÁLISE BROMATOLÓGICA E AVALIAÇÃO DAS PROPRIEDADES ANTIOXIDANTES  
DO SUCO PASTEURIZADO DE CUPUAÇU (*Theobroma grandiflorum*)  
FERMENTADO POR *Lactocaseibacillus rhamnosus* ATCC 9595**

origem vegetais aprimora o seu valor nutricional, intensificam ou adicionam características funcionais, além de prolongar a vida útil das bebidas <sup>9,21</sup>.

Ademais, o desenvolvimento de sucos de frutas e outros produtos vegetais com probióticos possibilita que pessoas com restrições ao leite (veganos, intolerantes à lactose e com alergia à proteína do leite de vaca) tenham acesso aos múltiplos benefícios do consumo desses microrganismos <sup>21,22</sup>. Estudos recentes demonstram o consumo de probióticos é crucial para o equilíbrio da microbiota intestinal, melhorando a função digestiva e imunológica <sup>23</sup>. Adicionalmente, a suplementação de probióticos têm efeitos benéficos na saúde mental e no tratamento de enfermidades infecciosas e crônicas <sup>24,25</sup>.

### 3.2. Análises microbiológicas

As análises microbiológicas revelaram que as amostras de sucos pasteurizados de cupuaçu fermentadas ou não se encontraram nos padrões estabelecidos pelas diretrizes brasileiras para sucos <sup>13</sup>, não apresentado nenhum dos seguintes patógenos de forma detectável ao longo dos 28 dias de armazenamento (Tabela 1).

**Tabela 1:** Análise microbiológica de sucos pasteurizados de cupuaçu (*Theobroma grandiflorum*).

Patógeno (/mL)	T0	T7	T14	T21	T28
	S/SF	S/SF	S/SF	S/SF	S/SF
Bolores e Leveduras	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0
<i>Enterobacteriaceae</i>	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0
<i>Salmonella</i>	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0
<i>Escherichia coli</i>	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0

S = Suco de cupuaçu; SF = Suco de cupuaçu fermentado

### 3.3. Análises físico-químicas

Durante o período de armazenamento também foram analisadas as possíveis alterações físico-químicas dos produtos. Não foram detectadas alterações significativas nos teores de Cinzas, umidade e  $B^{\circ}$  ( $p > 0,05$ ) nos períodos analisados. Em relação ao pH, o suco não fermentado apresentou um aumento significativo ao final do período de armazenamento ( $p < 0,05$ ) (Tabela 2).



**ANÁLISE BROMATOLÓGICA E AVALIAÇÃO DAS PROPRIEDADES ANTIOXIDANTES  
DO SUCO PASTEURIZADO DE CUPUAÇU (*Theobroma grandiflorum*)  
FERMENTADO POR *Lactocaseibacillus rhamnosus* ATCC 9595**

**Tabela 2:** Análises físico-químicas de sucos pasteurizados de cupuaçu (*Theobroma grandiflorum*).

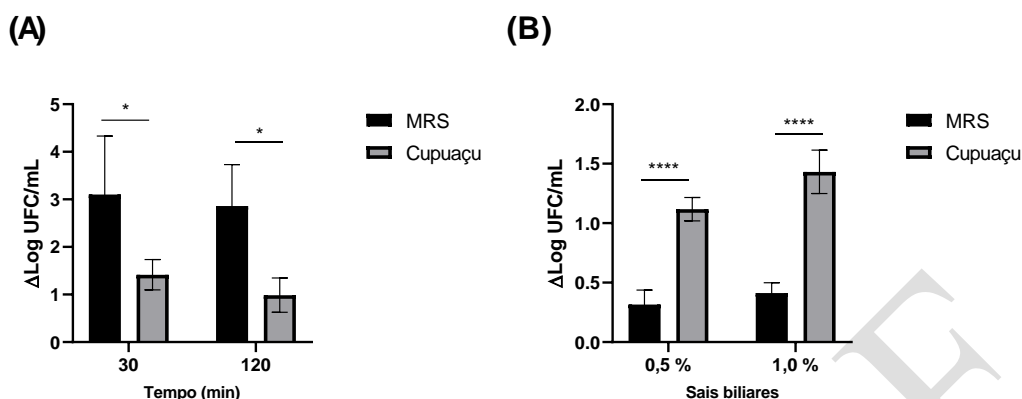
	Cinzas (%)		Umidade (%)		Brix (B°)		pH	
	S	SF	S	SF	S	SF	S	SF
T0	0,81 ± 0,04 <sup>a,1</sup>	0,86 ± 0,06 <sup>a,1</sup>	96,92 ± 0,20 <sup>a,1</sup>	96,83 ± 0,20 <sup>a,1</sup>	3 <sup>a,1</sup>	3 <sup>a,1</sup>	5,16 ± 0,05 <sup>a,1</sup>	4,2 ± 0,03 <sup>a,2</sup>
T7	0,81 ± 0,04 <sup>a,1</sup>	0,72 ± 0,10 <sup>a,1</sup>	96,66 ± 0,03 <sup>a,1</sup>	96,61 ± 0,001 <sup>a,1</sup>	3 <sup>a,1</sup>	3 <sup>a,1</sup>	5,26 ± 0,05 <sup>b,1</sup>	4,4 ± 0,03 <sup>b,2</sup>
T14	0,78 ± 0,20 <sup>a,1</sup>	0,84 ± 0,10 <sup>a,1</sup>	96,78 ± 0,002 <sup>a,1</sup>	96,75 ± 0,03 <sup>a,1</sup>	3 <sup>a,1</sup>	3 <sup>a,1</sup>	5,12 ± 0,04 <sup>a,1</sup>	4,32 ± 0,00 <sup>c,2</sup>
T21	0,83 ± 0,20 <sup>a,1</sup>	0,83 ± 0,08 <sup>a,1</sup>	96,56 ± 0,1 <sup>a,1</sup>	96,55 ± 0,05 <sup>a,1</sup>	3 <sup>a,1</sup>	3 <sup>a,1</sup>	5,00 ± 0,01 <sup>c,1</sup>	4,27 ± 0,01 <sup>c,2</sup>
T28	0,81 ± 0,50 <sup>a,1</sup>	0,56 ± 0,20 <sup>a,1</sup>	96,71 ± 0,01 <sup>a,1</sup>	96,60 ± 0,00 <sup>a,1</sup>	3 <sup>a,1</sup>	3 <sup>a,1</sup>	5,95 ± 0,01 <sup>d,1</sup>	4,34 ± 0,02 <sup>c,2</sup>

S = Suco de cupuaçu; SF = Suco de cupuaçu fermentado. Em cada coluna, valores com diferenças estatisticamente significativas estão indicados por letras sobrescritas (<sup>a,b,c</sup>) diferentes. Para cada parâmetro analisado em um determinado tempo (linhas), valores com diferenças estatisticamente significativas estão indicados por números sobrescritos (<sup>1,2</sup>) diferentes. Valores analisados pelo teste *Two-way-ANOVA*.

### 3.4. Simulação *in vitro* do trato gastrointestinal de *Lactocaseibacillus rhamnosus* ATCC 9595 no suco de Cupuaçu

Em seguida, foi avaliado a sobrevivência de *L. rhamnosus* ATCC 9595 no suco de cupuaçu em condições diversas encontradas no trato gastrointestinal (Figura 2). *L. rhamnosus* ATCC 9595 resistiu a ação da lisozima (100 mg/L) quando cultivado no suco de cupuaçu e no caldo MRS (Figura 2A). No entanto, foi possível observar uma maior resistência no suco de cupuaçu, nos dois tempos analisados ( $p < 0,05$ ). Estes dados foram semelhantes aos reportados para *L. rhamnosus* ATCC 9595 crescido em suco de bacuri<sup>12</sup>. Semelhantemente, *L. rhamnosus* ATCC 9595 resistiu à exposição aos sais biliares (0,5% a 1,0%), obtendo variações semelhantes quando cultivado em MRS ou suco de cupuaçu (Figura 2B).

ANÁLISE BROMATOLÓGICA E AVALIAÇÃO DAS PROPRIEDADES ANTIOXIDANTES  
DO SUCO PASTEURIZADO DE CUPUAÇU (*Theobroma grandiflorum*)  
FERMENTADO POR *Lactocaseibacillus rhamnosus* ATCC 9595



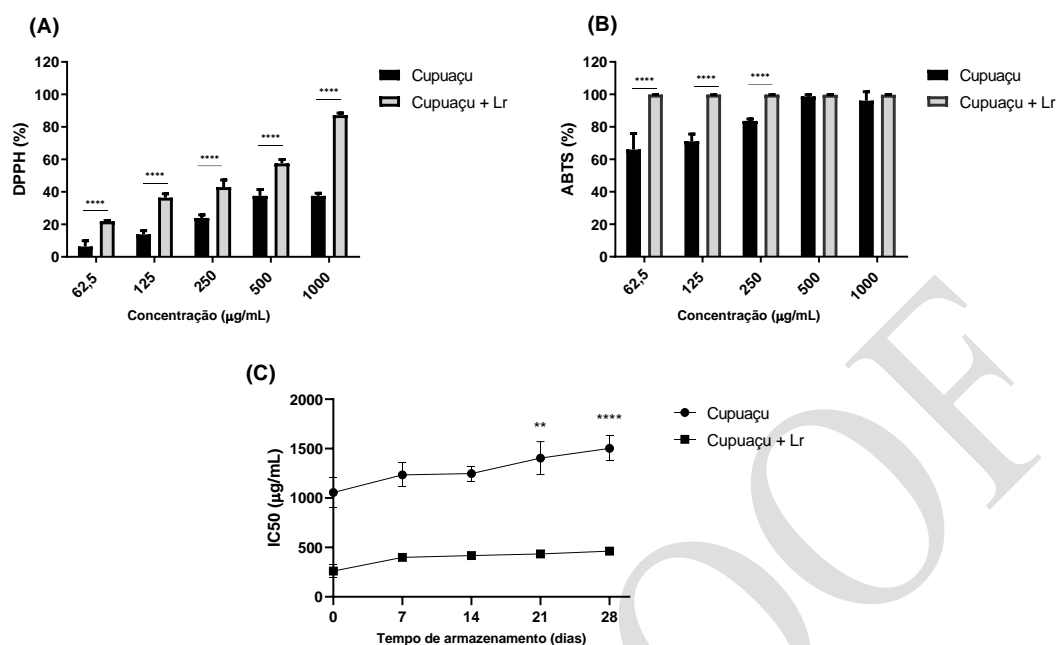
**Figura 2:** Teste de tolerância às condições simuladas do trato gastrointestinal. (A) teste de tolerância a lisozima. (B) Teste de tolerância aos sais biliares. \* $p < 0,05$ ; \*\*\*\* $p < 0,0001$ . Valores analisados pelo teste *Two-way-ANOVA*.

### 3.5. Efeito da fermentação nas propriedades antioxidantes e teores de compostos fenólicos e flavonoides do suco de cupuaçu

A capacidade antioxidante do suco de cupuaçu fermentado ou não por *L. rhamnosus* ATCC 9595 foi avaliada pelos ensaios de DPPH e ABTS (Figura 3). Foi possível observar que as propriedades antioxidantes do suco de cupuaçu aumentaram significativamente devido à fermentação por *L. rhamnosus* ATCC 9595. Na análise comparativa, foram observadas diferenças significativas em todas as concentrações no ensaio de DPPH, e nas concentrações  $\leq 250 \mu\text{g/mL}$  no ensaio ABTS. As amostras de suco fermentado submetidas ao armazenamento apresentaram valores de IC50 semelhantes ao do dia 0, enquanto o extrato não fermentado apresentou variação a partir do dia 21 (Figura 3C).

Os resultados obtidos com a fermentação do suco de cupuaçu pasteurizado corroboram com diversos estudos que demonstram a eficácia da fermentação láctica por cepas de *L. rhamnosus* (isoladas ou em cocultura) no incremento das propriedades antioxidantes de sucos de frutas, como suco de laranja fortificado com urtiga<sup>26</sup> e suco misto de juçara e manga<sup>27</sup>.

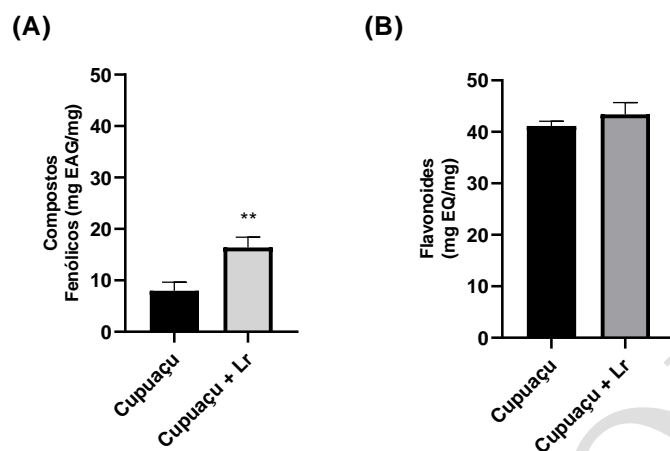
**ANÁLISE BROMATOLÓGICA E AVALIAÇÃO DAS PROPRIEDADES ANTIOXIDANTES  
DO SUCO PASTEURIZADO DE CUPUAÇU (*Theobroma grandiflorum*)  
FERMENTADO POR *Lactocaseibacillus rhamnosus* ATCC 9595**



**Figura 3:** Avaliação das propriedades antioxidantes dos sucos pasteurizados de *Theobroma grandiflorum*. (A) Avaliação da atividade antioxidante pelo método DPPH. (B) Avaliação da atividade antioxidante pelo método ABTS; (C) Avaliação da atividade antioxidante pelo método DPPH de amostras obtidas durante o armazenamento. IC50= Concentração que inibe 50% do radical; \*\*\*\* p < 0,0001. Valores analisados pelo teste *Two-way-ANOVA*.

Na figura 4 estão apresentados os teores de compostos fenólicos totais e flavonoides das amostras de suco de cupuaçu fermentados ou não por *L. rhamnosus*. Foi observado que a fermentação significativamente aumentou os teores de compostos fenólicos totais (p<0,01), no entanto, não foram detectadas alterações no conteúdo de flavonoides.

**ANÁLISE BROMATOLÓGICA E AVALIAÇÃO DAS PROPRIEDADES ANTIOXIDANTES  
DO SUCO PASTEURIZADO DE CUPUAÇU (*Theobroma grandiflorum*)  
FERMENTADO POR *Lactocaseibacillus rhamnosus* ATCC 9595**



**Figura 4:** Dosagem de compostos fenólicos totais (A) e flavonoides (B) dos sucos fermentado e não fermentado de cupuaçu. EAG: Equivalente de ácido gálico; EQ: Equivalente de quercetina. \*\*  $p < 0,01$ . Valores analisados pelo teste t de Student.

Uma dieta rica em compostos fenólicos está relacionada à diminuição do risco de infarto do miocárdio, acidente vascular cerebral e diabetes, uma vez que melhora o perfil lipídico, a pressão arterial, a resistência à insulina e a inflamação sistêmica<sup>28</sup>. Em especial, os flavonoides são abundantes nas frutas, sendo responsáveis pela cor, sabor e cheiro. Devido às suas características antioxidantes e anti-inflamatórias, são importantes na prevenção e tratamento de doenças cardiovasculares, diabetes, distúrbios neurológicos e câncer<sup>29</sup>.

#### 4. CONCLUSÃO

Os resultados obtidos neste estudo reafirmam o potencial do suco cupuaçu no desenvolvimento de bebidas probióticas. As amostras de sucos (fermentados ou não fermentados por *L. rhamnosus* ATCC 9595) apresentaram-se segundo as diretrizes brasileiras mesmo após 28 dias de refrigeração. As amostras armazenadas dos dois sucos não apresentaram alterações significativas nos teores de Cinzas, umidade e  $B^{\circ}$  nos períodos analisados; no entanto foi detectado aumento nos valores de pH apenas para o suco não fermentado. Importaneamente, a população de *L. rhamnosus* ATCC 9595 se manteve estável durante o armazenamento. *L. rhamnosus* ATCC 9595 cultivado no suco de cupuaçu apresentou resistência às condições adversas simuladas pelo trato gastrointestinal. Adicionalmente, a fermentação com *L.*

**ANÁLISE BROMATOLÓGICA E AVALIAÇÃO DAS PROPRIEDADES ANTIOXIDANTES  
DO SUCO PASTEURIZADO DE CUPUAÇU (*Theobroma grandiflorum*)  
FERMENTADO POR *Lacticaseibacillus rhamnosus* ATCC 9595**

*rhamnosus* ATCC 9595 aumentou significativamente as características antioxidantes do suco de cupuaçu, um achado relacionado ao aumento de compostos fenólicos totais.

Neste contexto, sugere-se que a fermentação do suco de cupuaçu por *L. rhamnosus* ATCC 9595 é uma estratégia eficiente para aumento das propriedades antioxidantes. A bebida elaborada é um produto probiótico livre de lactose, interessante para o mercado vegano e para indivíduos com intolerância e alergia, além de ser um alimento funcional com o potencial de aliviar os danos patológicos induzidos pelos radicais livres.

## REFERÊNCIAS

- 1 Zaric BL, Macvanin MT, Isenovic ER. Free radicals: Relationship to Human Diseases and Potential Therapeutic applications. *Int J Biochem Cell Biol* 2023; 154. doi:10.1016/J.BIOCEL.2022.106346.
- 2 Demirci-Çekiç S, Özkan G, Avan AN, Uzunboy S, Çapanoğlu E, Apak R. Biomarkers of Oxidative Stress and Antioxidant Defense. *J Pharm Biomed Anal* 2022; 209: 114477.
- 3 Sharifi-Rad M, Anil Kumar N v., Zucca P, Varoni EM, Dini L, Panzarini E *et al.* Lifestyle, Oxidative Stress, and Antioxidants: Back and Forth in the Pathophysiology of Chronic Diseases. *Front Physiol* 2020; 11: 694.
- 4 Matzembacher dos Santos J, Gomes Heck T. Oxidative stress in type 2 diabetes and the impact of exercise: from mitochondria to glucose management in skeletal muscle. *Revista Contexto & Saúde* 2022; 22: e11425–e11425.
- 5 Forman HJ, Zhang H. Targeting oxidative stress in disease: promise and limitations of antioxidant therapy. *Nature Reviews* 2021; 20: 689.
- 6 Giampieri F, Battino M. Bioactive Phytochemicals and Functional Food Ingredients in Fruits and Vegetables. *Int J Mol Sci* 2020; 21. doi:10.3390/IJMS21093278.
- 7 Punaro GR, Lima DY, Rodrigues AM, Pugliero S, Mouro MG, Rogero MM *et al.* Cupuaçu extract reduces nitrosative stress and modulates inflammatory mediators in the kidneys of experimental diabetes. *Clinical Nutrition* 2019; 38: 364–371.
- 8 Rodrigues DBB, Punaro GR, de LIMA DY, Rodrigues AM, Pugliero S, Higa EMS. Cupuaçu extract protects the kidneys of diabetic rats by modulating Nrf2/NF-κB p65 and iNOS. *An Acad Bras Cienc* 2023; 95: e20220927.
- 9 Zagnignan A, Mendes YC, Mesquita GP, Santos GDC dos, Silva L dos S, de Souza Sales AC *et al.* Short-Term Intake of *Theobroma grandiflorum* Juice Fermented with *Lacticaseibacillus rhamnosus* ATCC 9595 Amended the Outcome of Endotoxemia Induced by Lipopolysaccharide. *Nutrients* 2023; 15. doi:10.3390/NU15041059.

**ANÁLISE BROMATOLÓGICA E AVALIAÇÃO DAS PROPRIEDADES ANTIOXIDANTES  
DO SUCO PASTEURIZADO DE CUPUAÇU (*Theobroma grandiflorum*)  
FERMENTADO POR *Lactocaseibacillus rhamnosus* ATCC 9595**

- 10 Ribeiro FC, de Barros PP, Rossoni RD, Junqueira JC, Jorge AOC. Lactobacillus rhamnosus inhibits Candida albicans virulence factors in vitro and modulates immune system in Galleria mellonella. *J Appl Microbiol* 2017; 122: 201–211.
- 11 Mendi A, Köse S, Uçkan D, Akca G, Yilmaz D, Aral L *et al.* Lactobacillus rhamnosus could inhibit Porphyromonas gingivalis derived CXCL8 attenuation. *Journal of Applied Oral Science* 2016; 24: 67–75.
- 12 Mendes YC, Mesquita GP, Costa GDE, Barbosa da Silva AC, Gouveia E, Silva MRC *et al.* Evaluation of Growth, Viability, Lactic Acid Production and Anti-Infective Effects of Lactocaseibacillus rhamnosus ATCC 9595 in Bacuri Juice (Platonia insignis). *Foods* 2021; 10: 603.
- 13 Brasil. Agência Nacional de Vigilância Sanitária, INSTRUÇÃO NORMATIVA N° 60, DE 23 DE DEZEMBRO DE 2019 - INSTRUÇÃO NORMATIVA N° 60, DE 23 DE DEZEMBRO DE 2019 - DOU - Imprensa Nacional. 2019<https://www.in.gov.br/web/dou/-/instrucao-normativa-n-60-de-23-de-dezembro-de-2019-235332356> (accessed 17 Aug2023).
- 14 Zenebon O, Pascuet NS. Métodos físico-químicos para análise de alimentos. 2005; : 1018–1018.
- 15 Silva B, Jung LRC, Sandes SHC, Alvim LB, Bomfim MRQ, Nicoli JR *et al.* In vitro assessment of functional properties of lactic acid bacteria isolated from faecal microbiota of healthy dogs for potential use as probiotics. *Benef Microbes* 2013.
- 16 Silva TF, Cavalcanti Filho JRN, Fonsêca MMLB, Santos NM dos, Silva ACB da, Zagnignan A *et al.* Products Derived from Buchenavia tetraphylla Leaves Have In Vitro Antioxidant Activity and Protect Tenebrio molitor Larvae against Escherichia coli-Induced Injury. *Pharmaceuticals* 2020; 13: 46.
- 17 Brasil. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. RDC N° 241, DE 26 DE JULHO DE 2018. 2018<http://antigo.anvisa.gov.br/legislacao#/visualizar/378665> (accessed 17 Aug2023).
- 18 Brasil. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Guia para instrução processual de petição de avaliação de probióticos para uso em alimentos. 2021<http://antigo.anvisa.gov.br/guias#/visualizar/448269> (accessed 17 Aug2023).
- 19 Brasil. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Alimentos com alegações de propriedades funcionais e ou de saúde, novos alimentos/ingredientes, substâncias bioativas e probióticos: IX lista de alegações de propriedade funcional aprovada, atualizado em julho/2008. 2008.
- 20 Ruiz Rodríguez LG, Zamora Gasga VM, Pescuma M, Van Nieuwenhove C, Mozzi F, Sánchez Burgos JA. Fruits and fruit by-products as sources of bioactive compounds. Benefits and trends of lactic acid fermentation in the development of novel fruit-based functional beverages. *Food Research International* 2021; 140: 109854.
- 21 Naseem Z, Mir SA, Wani SM, Rouf MA, Bashir I, Zehra A. Probiotic-fortified fruit juices: Health benefits, challenges, and future perspective. *Nutrition* 2023; 115. doi:10.1016/J.NUT.2023.112154.
- 22 Maia MS, Domingos MM, de São José JFB. Viability of Probiotic Microorganisms and the Effect of Their Addition to Fruit and Vegetable Juices. *Microorganisms* 2023; 11. doi:10.3390/MICROORGANISMS11051335.

**ANÁLISE BROMATOLÓGICA E AVALIAÇÃO DAS PROPRIEDADES ANTIOXIDANTES  
DO SUCO PASTEURIZADO DE CUPUAÇU (*Theobroma grandiflorum*)  
FERMENTADO POR *Lactocaseibacillus rhamnosus* ATCC 9595**

- 23 Dahiya D, Nigam PS. Nutrition and Health through the Use of Probiotic Strains in Fermentation to Produce Non-Dairy Functional Beverage Products Supporting Gut Microbiota. *Foods* 2022; 11. doi:10.3390/FOODS11182760.
- 24 Schneider E, Doll JPK, Schweinfurth N, Kettelhack C, Schaub AC, Yamanbaeva G *et al.* Effect of short-term, high-dose probiotic supplementation on cognition, related brain functions and BDNF in patients with depression: a secondary analysis of a randomized controlled trial. *J Psychiatry Neurosci* 2023; 48: E23–E33.
- 25 Gutiérrez-Castrellón P, Gandara-Martí T, Abreu Y Abreu AT, Nieto-Rufino CD, López-Orduña E, Jiménez-Escobar I *et al.* Probiotic improves symptomatic and viral clearance in Covid19 outpatients: a randomized, quadruple-blinded, placebo-controlled trial. *Gut Microbes* 2022; 14. doi:10.1080/19490976.2021.2018899.
- 26 Sengun IY, Kirmizigul A, Atlama K, Yilmaz B. The viability of *Lactobacillus rhamnosus* in orange juice fortified with nettle (*Urtica dioica* L.) and bioactive properties of the juice during storage. *LWT* 2020; 118: 108707.
- 27 Prates FC, de Castro Leite Júnior BR, Martins EMF, Cristianini M, da Silva RR, da Rocha Campos AN *et al.* Development of a mixed jussara and mango juice with added *Lactobacillus rhamnosus* GG submitted to sub-lethal acid and baric stresses. *J Food Sci Technol* 2020; 57: 4524–4532.
- 28 Rana A, Samtiya M, Dhewa T, Mishra V, Aluko RE. Health benefits of polyphenols: A concise review. *J Food Biochem* 2022; 46. doi:10.1111/JFBC.14264.
- 29 Dias MC, Pinto DCGA, Silva AMS, Giovinazzo G, Gerardi C, Mosca L. Plant Flavonoids: Chemical Characteristics and Biological Activity. *Molecules* 2021, Vol 26, Page 5377 2021; 26: 5377.

Submetido em: 21/8/2023

Aceito em: 25/3/2024

Publicado em: 6/5/2024

**Contribuições dos autores:**

Daniel dos Santos Guimarães – Metodologia, validação de dados e experimento e Design da apresentação de dados.

Camila Caetano da Silva - Metodologia, validação de dados e experimento, design da apresentação de dados, redação do manuscrito original.

Kátia Sayuri Aragão Aguiar - Metodologia, validação de dados e experimento.

Alexia Figueiredo Ferreira - Metodologia, validação de dados e experimento.

ANÁLISE BROMATOLÓGICA E AVALIAÇÃO DAS PROPRIEDADES ANTIOXIDANTES  
DO SUCO PASTEURIZADO DE CUPUAÇU (*Theobroma grandiflorum*)  
FERMENTADO POR *Lactocaseibacillus rhamnosus* ATCC 9595

Marcos Andrade Silva – Metodologia.

Luís Cláudio Nascimento da Silva - Conceituação, Análise formal, Obtenção de financiamento, administração do projeto, supervisão e redação do manuscrito original.

Adrielle Zigmignan – Conceituação, Análise formal, Obtenção de financiamento, administração do projeto, supervisão e redação do manuscrito original.

Todos os autores aprovaram a versão final do texto.

Conflito de interesse: Não há conflito de interesse.

Este trabalho foi financiado pela Fundação de Amparo à Pesquisa e ao Desenvolvimento Científico e Tecnológico do Maranhão (Processo: Universal 00881/19, POS-GRAD-02460/21, INFRA-02032/21) e Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (Processo: 312349/2020-3)

**Autor correspondente:**

Adrielle Zigmignan

Universidade Ceuma

Rua Anapurus, n.1, Renascença II, São Luís/MA, Brasil - CEP: 65075-120

E-mail: [adrielle004602@ceuma.com.br](mailto:adrielle004602@ceuma.com.br)

Editor: Dr. Matias Nunes Frizzo

Editora chefe: Dra. Adriane Cristina Bernat Kolankiewicz

Este é um artigo de acesso aberto distribuído sob os termos da licença Creative Commons.

