



UNIVERSIDADE FEDERAL DO MARANHÃO
CENTRO DE CIÊNCIAS DE IMPERATRIZ
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM SAÚDE E TECNOLOGIA

FERNANDA FARIAS COSTA

**AVALIAÇÃO DO POTENCIAL IMUNOMODULADOR, ANTIOXIDANTE E
ANTIBACTERIANO DE BEBIDAS MISTAS PROBIÓTICAS ELABORADAS COM
BABAÇU E BURITI OU CAJU**

IMPERATRIZ, MA

2025

FERNANDA FARIAS COSTA

AVALIAÇÃO DO POTENCIAL IMUNOMODULADOR, ANTIOXIDANTE E
ANTIBACTERIANO DE BEBIDAS MISTAS PROBIÓTICAS ELABORADAS COM
BABAÇU E BURITI OU CAJU

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Saúde e Tecnologia da Universidade Federal do Maranhão, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Saúde e Tecnologia. Área de concentração: Saúde e Tecnologia. Linha de Pesquisa: Tecnologias em Saúde.

Orientadora: Profa. Dra. Márcia Cristina Gonçalves Maciel
Coorientador: Prof. Dr. Aramys Silva Reis

IMPERATRIZ-MA

2025

Serviços da Biblioteca da Universidade Federal do Maranhão

Farias Costa, Fernanda.

AVALIAÇÃO DO POTENCIAL IMUNOMODULADOR, ANTIOXIDANTE E ANTIBACTERIANO DE BEBIDAS MISTAS PROBIÓTICAS ELABORADAS COM BABAÇU E BURITI OU CAJU / Fernanda Farias Costa. – 2025
97 p.

Coorientador (a) : Aramys Silva dos Reis.

Orientador (a) : Márcia Cristina Gonçalves Maciel.

Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós-graduação em Saúde e Tecnologia/ccim, Universidade Federal do Maranhão, Imperatriz, 2025.

1. Bebidas probióticas vegetais. 2. Fermentação probiótica. 3. Atividade antioxidante. 4. Atividade imunomoduladora. I. Cristina Gonçalves maciel, Márcia. II. Silva dos Reis, Aramys. III. Título.

FERNANDA FARIAS COSTA

AVALIAÇÃO DO POTENCIAL IMUNOMODULADOR, ANTIOXIDANTE E
ANTIBACTERIANO DE BEBIDAS MISTAS PROBIÓTICAS ELABORADAS COM
BABAÇU E BURITI OU CAJU

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Saúde e Tecnologia da Universidade Federal do Maranhão, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Saúde e Tecnologia. Área de concentração: Saúde e Tecnologia. Linha de Pesquisa: Tecnologias em Saúde.

BANCA EXAMINADORA

Profa. Dra. Márcia Cristina Gonçalves Maciel (Orientador)
Universidade Federal do Maranhão (UFMA)

Prof. Dr. Aramys Silva Reis (Coorientador)
Universidade Federal do Maranhão (UFMA)

Prof. Dr. Valério Monteiro Neto
Universidade Federal do Maranhão (UFMA)

Prof. Dr. Paulo Vitor Soeiro Pereira
Universidade Federal do Maranhão (UFMA)

A Deus, que jamais me desamparou.

À menina que um dia achou que o Hulk era o herói mais legal porque era um cientista, e quis ser uma também, embora não verde.

A minha mãe e tia, e as mulheres da minha família.

AGRADECIMENTOS

Agradeço, em primeiro lugar, a Deus, que me deu a força e a resiliência necessárias para continuar, independentemente das dificuldades pelo caminho. À minha família, que me apoiou em minhas escolhas e me deu o suporte necessário para seguir o sonho da carreira acadêmica, em especial à minha mãe, Francimeire, que orou por cada projeto, e à minha tia, Fábiana, que foi paciente comigo. Às minhas meninas, que comemoraram cada conquista, torceram e acreditaram quando nem eu o fiz.

Agradeço à Universidade Federal do Maranhão e ao Programa de Pós-Graduação em Saúde e Tecnologia, bem como a todos os professores do corpo docente, que contribuíram imensamente para minha formação como mestre, por meio de cada ensinamento. À minha orientadora, Professora Dra. Márcia Cristina G. Maciel, pela oportunidade e orientação. Agradeço ao meu querido coorientador, Professor Dr. Aramys Silva Reis, pelos ensinamentos valiosos, pela atenção, pelas oportunidades e pela parceria — por me ensinar a ser uma pesquisadora melhor e por ser esse professor e ser humano maravilhoso.

Aos professores participantes da banca examinadora, Ana Lúcia Fernandes Pereira e Wellyson da Cunha Araujo Firmo, pelo tempo, pelas valiosas colaborações e sugestões. Ao Laboratório de Fisiopatologia e Investigação Terapêutica (LAFIT), da Universidade Federal do Maranhão, campus Imperatriz-MA, e ao Laboratório de Química de Produtos Naturais (LQPN), também em Imperatriz-MA, onde a maior parte dos experimentos foi realizada. Aos parceiros e amigos dos laboratórios, que estiveram comigo em cada momento e contribuíram com apoio e leveza na jornada até aqui. Às agências de fomento CAPES, CNPq e FAPEMA, pelo apoio financeiro.

“Que seu remédio seja seu alimento, e que seu alimento seja seu remédio.”

(Hipócrates)

RESUMO

Bebidas fermentadas de origem vegetal vem se consolidando entre os alimentos funcionais por sua aceitabilidade e potencial de promoção a saúde, principalmente para pessoas que não consomem leite e derivados. Nesse contexto, a matriz vegetal escolhida e a cepa usada para a fermentação podem potencializar a produção de bioativos com propriedades imunomoduladoras, antioxidantes e antibacterianas por mecanismos distintos. O objetivo deste trabalho foi investigar se a fermentação por *Lactocaseibacillus casei* potencializa os efeitos antioxidantes, antimicrobianos e imunomoduladores de bebidas mistas à base de babaçu com buriti ou caju, a partir de uma revisão prévia dos mecanismos funcionais de bebidas probióticas mistas de base vegetal. A dissertação foi delineada em dois capítulos. O capítulo I traz uma revisão integrativa da literatura já publicada intitulada “Propriedades Antioxidantes e Antimicrobianas dos probióticos: Insights de ensaios *in vitro*”. O trabalho discute os principais mecanismos de ação e métodos analíticos utilizados, com base em publicações selecionadas nas bases MEDLINE (PubMed), Web of Science, Scopus, Science Direct e Embase, onde foi observada a variação do conteúdo de bioativos como fenólicos e flavonoides após a fermentação e melhora em sua bioacessibilidade, além de atividade antioxidante e antimicrobiana tanto dos fermentados quanto dos probióticos em estudos *in vitro*. O capítulo II com o título “Bebidas probióticas mistas com babaçu: Atividade imunomoduladora, antioxidante e antibacteriana da combinação com buriti ou caju”, onde foram avaliados fatores ligados as propriedades funcionais dos fermentados, como a sobrevivência das bactérias probióticas, a acidez, o conteúdo fenólico e de flavonoides, citotoxicidade, atividade imunomoduladora, antioxidante e antibacteriana para bebidas mistas fermentadas ou não fermentadas. As bebidas mistas de Babaçu e Buriti, e Babaçu e Caju foram adequadas para o crescimento e manutenção da viabilidade dos probióticos (>8 Log UFC), o conteúdo de ácidos aumentou após a fermentação com consequente diminuição do pH. O conteúdo de fenólicos totais (BBnF: $12 \pm 0,02$ BBF: $8,4 \pm 0,02$ BCnF: $14 \pm 0,03$ BCF: $8,8 \pm 0,02$ mg EQ g⁻¹) e flavonoides (BBnF: $0,216 \pm 0,005$ BBF: $0,152 \pm 0,003$ BCnF: $0,268 \pm 0,003$ BCF: $0,152 \pm 0,005$ mg EQ g⁻¹) reduziu após a fermentação, entretanto isso não afetou significativamente a atividade antioxidante das bebidas fermentadas, que se manteve após a fermentação probiótica e em alguns casos melhorou (DPPH – BBnF > BBF 1:8 e 1:16 BCnF < BCF 1:32 /PL – BBnF > BBF em 1:4 e 1:8 BBnF < BBF em 1:32 BCnF < BCF em 1:32). As bebidas não fermentadas tiveram boa viabilidade celular em todas as concentrações avaliadas, e as fermentadas tiveram toxicidade observada para o fator de diluição 1:2. No ensaio de concentração inibitória mínima as bebidas mistas, fermentada e não fermentada, não apresentaram atividade antibacteriana em nenhuma concentração testada (1:2, 1:4, 1:8, 1:16, 1:32). A dosagem de óxido nítrico no sobrenadante da cultura de macrófagos revelou que as bebidas não fermentadas apresentaram capacidade de redução da produção do NO em todos os tempos de pré-tratamento em diferentes concentrações (1:4, 1:8 e 1:16) enquanto os fermentados apenas após 24 horas de pré-exposição e somente na maior concentração (1:4), além de aumento do radical em concentrações menores (1:8, 1:16 e 1:32). Os dados indicam que a fermentação promoveu alterações nas bebidas mistas de babaçu com buriti ou caju, mantendo ou melhorando a atividade antioxidante, porém não conferiu atividade antibacteriana, além disso, as bebidas não fermentadas apresentaram maior potencial imunomodulador, evidenciado pela maior capacidade de reduzir a produção de óxido nítrico em diferentes condições.

Palavras-chave: Bebidas probióticas vegetais, Fermentação probiótica, atividade antioxidante, atividade imunomoduladora.

ABSTRACT

Fermented beverages of plant origin have been gaining recognition as functional foods due to their acceptability and potential health benefits, particularly for individuals who do not consume milk and dairy products. In this context, the selected plant matrix and the strain used for fermentation can enhance the production of bioactive compounds with immunomodulatory, antioxidant, and antibacterial properties through distinct mechanisms. The objective of this study was to evaluate whether the fermentation process by the probiotic microorganism *Lactocaseibacillus casei* could contribute to the functional potential of two mixed beverages: Babassu and Buriti, and Babassu and Cashew. This dissertation is structured into two chapters. Chapter I presents an integrative review of the existing literature, titled “Antioxidant and Antimicrobial Properties of Probiotics: Insights from In Vitro Assays.” The study discusses the main mechanisms of action and analytical methods employed, based on selected publications from the MEDLINE (PubMed), Web of Science, Scopus, Science Direct, and Embase databases. The review highlights variations in the content of bioactive compounds such as phenolics and flavonoids following fermentation, as well as improvements in their bioaccessibility, in addition to antioxidant and antimicrobial activity observed in both fermented products and probiotics in in vitro studies. Chapter II, titled “Mixed Probiotic Beverages with Babassu: Immunomodulatory, Antioxidant, and Antibacterial Activity of Combinations with Buriti or Cashew,” evaluates factors related to the functional properties of fermented beverages, such as probiotic bacterial survival, acidity, phenolic and flavonoid content, cytotoxicity, and immunomodulatory, antioxidant, and antibacterial activity in fermented and non-fermented mixed beverages. The Babassu and Buriti, and Babassu and Cashew mixed beverages supported the growth and viability of probiotics (>8 Log CFU). Acid content increased after fermentation, leading to a corresponding decrease in pH. Total phenolic content (BBnF: 12 ± 0.02 , BBF: 8.4 ± 0.02 , BCnF: 14 ± 0.03 , BCF: 8.8 ± 0.02 mg GAE g^{-1}) and flavonoid content (BBnF: 0.216 ± 0.005 , BBF: 0.152 ± 0.003 , BCnF: 0.268 ± 0.003 , BCF: 0.152 ± 0.005 mg QE g^{-1}) decreased after fermentation; however, this did not significantly affect the antioxidant activity of the fermented beverages, which was maintained or, in some cases, even improved after probiotic fermentation (DPPH – BBnF > BBF at 1:8 and 1:16, BCnF < BCF at 1:32 / PL – BBnF > BBF at 1:4 and 1:8, BBnF < BBF at 1:32, BCnF < BCF at 1:32). Non-fermented beverages exhibited good cell viability across all tested concentrations, while fermented beverages displayed toxicity at a 1:2 dilution factor. In the minimum inhibitory concentration assay, none of the tested concentrations (1:2, 1:4, 1:8, 1:16, 1:32) exhibited antibacterial activity. Nitric oxide quantification in the supernatant of macrophage cultures revealed that the non-fermented beverages were able to reduce NO production at all pre-treatment times and across different concentrations (1:4, 1:8, and 1:16), whereas the fermented beverages exhibited this effect only after 24 hours of pre-exposure and exclusively at the highest concentration (1:4). Additionally, an increase in NO production was observed at lower concentrations (1:8, 1:16, and 1:32). The data indicate that fermentation induced changes in the mixed beverages of babassu with buriti or cashew, maintaining or enhancing their antioxidant activity; however, it did not confer antibacterial activity. Moreover, the non-fermented beverages exhibited greater immunomodulatory potential, as evidenced by their higher capacity to reduce nitric oxide production under different conditions.

Keywords: Plant-based probiotic beverages, Probiotic fermentation, Antioxidant activity, Immunomodulatory activity

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

REFERENCIAL TEÓRICO

Figura 1	Lista dos novos gêneros de <i>Lactobacillus</i>	20
Figura 2	Representação das propriedades antagônicas entre probióticos e patógenos...	23
Figura 3	Classes de bacteriocinas produzidas por bactérias produtoras de ácido láctico.	24
Figura 4	Prebióticos, probióticos e pósbióticos.....	26
Figura 5	Adeptos a dietas vegana e vegetariana ao redor do mundo.....	28
Figura 6	Babaçu (<i>Attalea speciosa</i> Mart ex Spreng).....	33
Figura 7	Buriti (<i>Mauritia flexuosa</i> L. f.)	35
Figura 8	Caju (<i>Anacardium occidentale</i> L.)	36
Figura 9	Impacto da fermentação nos bioativos de alimentos fermentados.....	38
Figura 10	Classificação de mecanismos associados a probióticos.....	40

CAPÍTULO I (ANEXO)

Figura 1	Flowchart of the article selection using PRISMA.....	94
Figura 2	Impact of Fermentation on the Antioxidant and Antimicrobial Activities of Probiotic in Fermented Beverages and Food.....	97

CAPÍTULO II

Figura 1	Esquema de incubação para dosagem de Óxido nítrico.....	63
Figura 2	Ensaio de citotoxicidade em GM07492A.....	66
Figura 3	Ensaio de citotoxicidade em RAW 264.7.....	67
Figura 4	Atividade antioxidante pelo sequestro do radical DPPH.....	68
Figura 5	Atividade antioxidante pela Inibição da Peroxidação Lipídica.....	69
Figura 6	Dosagem de Óxido Nítrico para as bebidas de babaçu e buriti, comparação entre tempo de pré-exposição.....	71
Figura 7	Dosagem de Óxido Nítrico para as bebidas de babaçu e caju, comparação entre tempo de pré-exposição.....	72

LISTA DE TABELAS

REFERENCIAL TEÓRICO

Tabela 1	Viabilidade probiótica em diferentes matrizes vegetais não lácteas.....	29
----------	---	----

CAPÍTULO I (ANEXO)

Tabela 1	Key findings in the evaluation of the properties of the studied probiotics.....	96
----------	---	----

CAPÍTULO II

Tabela 1	Valor de pH e Acidez das bebidas mistas.....	64
----------	--	----

Tabela 2	Conteúdo total de compostos fenólicos e flavonoides expressos em mg EAG/g amostra e mg EQ/g amostra, respectivamente.....	65
----------	---	----

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
AGCC	Ácidos graxos de cadeia curta
ASIC	Canais iônicos sensíveis ao ácido
ATP	Adenosina trifosfato
BAL	Bactérias do ácido láctico
BBF	Bebida de babaçu e buriti fermentada
BBnF	Bebida de babaçu e buriti não fermentada
BCF	Bebida de babaçu e caju fermentada
BCnF	Bebida de babaçu e caju não fermentada
CD8+	Linfócitos TCD8 ativado
CIM	Concentração inibitória mínima
CLP	Ligadura e punção cecal
COX2	Cicloxygenase 2
DAMP	Padrão molecular associado ao dano
DCNT	Doenças crônicas não transmissíveis
DMEN	Meio de Eagle modificado por Dulbecco
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNA	Ácido desoxiribonucleico
DP	Desvio padrão
ERO	Espécies reativas de oxigênio
FAO	Organização das Nações Unidas para Agricultura e Alimentação
FeSO	Sulfato ferroso
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
GRAS	do inglês <i>Generally Regarded As Safe</i>
H2O2	Peróxido de hidrogênio
IgA	Imunoglobulina A
IL1-β	Interleucina 1 β
IL-6	Interleucina 6
IL-10	Interleucina 10
IL-12	Interleucina 12

IL-17	Interleucina 17
IL-8	Interleucina 8
iNOS	Oxido nítrico sintase induzida
ISAPP	do inglês <i>International Scientific Association for Probiotics and Prebiotics</i>
LPS	Lipopolissacarídeo
MAPK	Proteína quinase ativada por mitógeno
MCP-1	Proteína quimiotática de monócitos 1
MRS	Ágar De Man, Rogosa e sSharpe
Mubs	Proteínas de ligação à mucina
NF-κB	fator nuclear kappa B
NK	Células natural killers
NO	Oxido nítrico
OMS	Organização mundial da Saúde
PAMPs	Padrão Molecular Associado a Patógenos
RDC	Resolução de diretoria Colegiada
RPM	Rotações por minuto
RPV1	Canal de potencial receptor transitório vaniloide subfamília 1
SBF	Soro fetal bovino
SLAPs	Proteínas associadas à camada de superfície
TBA	Ácido tiobarbitúrico
TCA	Ácido tricloroacético
TCD4+	Linfócitos TCD4 ativado
TGI	Trato gastrointestinal
TNF-α	Fator de necrose tumoral alfa
UFC	Unidade formadora de colônia

SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO.....	14
2.	OBJETIVO.....	17
2.1	Objetivos Específicos.....	17
3	REFERENCIAL TEÓRICO.....	18
3.1	Probióticos.....	18
3.2	Relação com a microbiota.....	22
3.3	Probióticos e matriz vegetal Babaçu.....	27
3.4	Babaçu.....	32
3.5	Buriti.....	34
3.6	Caju.....	35
3.7	Fermentação e matriz vegetal.....	36
3.8	Alegações de Saúde.....	39
4	REFERÊNCIAS.....	42
5	CAPÍTULO I (EM ANEXO)	55
6	CAPÍTULO II.....	56
	ANEXOS.....	90

1. INTRODUÇÃO

Probióticos são microrganismos potencialmente benéficos para a saúde humana, desde que administrado em quantidades adequadas (HILL et al., 2014). Eles são tradicionalmente usados na indústria de alimentos funcionais, sendo *Lactobacillus*, *Bifidobacterium*, e *Saccharomyces* os gêneros mais comuns. Estes microrganismos apresentam características indispensáveis aos probióticos, como a capacidade de colonizar o intestino humano, segurança, afinidade com células da mucosa e baixo custo. Além disso, eles apresentam atividade imunomoduladora, antimicrobiana e antioxidante (PLAZA-DÍAZ et al., 2020).

O principal alvo dos probióticos é o trato gastrointestinal, onde desempenham diversos papéis, tais como a regulação da microbiota intestinal, proteção contra infecções, estimulação imunológica, atividade anti-inflamatória, influência metabólica e proteção contra alguns tipos de câncer (WANG et al., 2021). O uso de probióticos pode melhorar o quadro de inflamação sistêmica em doenças crônicas, como diabetes e obesidade, e reduzir marcadores do estresse oxidativo (LOPES, et. al. 2018). No intestino, esses microrganismos são responsáveis pelo controle de patógenos através da competição, secreção de bacteriocinas e outros bioativos antimicrobianos (ANJANA; TIWARI, 2022). Probióticos são comumente utilizados como terapia adjuvante no tratamento de infecções intestinais, responsáveis por aproximadamente 1,5 milhão de óbitos em 2019. (HUEMER et al., 2020; WHO, 2019; HUANG et al., 2022).

Diante desse cenário, cresce o interesse por formas acessíveis de consumir probióticos, que tradicionalmente são incorporados a produtos lácteos (SU et al., 2022). Adeptos ao vegetarianismo e indivíduos lacto-intolerantes não consomem leite ou derivados, e podem encontrar dificuldade em ter acesso alimentos associados a probióticos (CSATLOS et al., 2023). Buscas recentes por matrizes de origem vegetal como veículo dos probióticos tem se intensificado para suprir essa necessidade (HOLKEM; SILVA; FAVARO-TRINDADE, 2023). Bebidas vegetais a base de castanhas e amêndoas se popularizaram nos últimos anos, pois são uma opção viável para o leite de origem animal, além de serem ricos em bioativos como compostos fenólicos e ácidos graxos insaturados, e são bons substratos para a fermentação (AYDAR; TUTUNCU; OZCELIK, 2020; ESPERANÇA et al., 2022). Probióticos associados a matriz vegetal apresentam atividade antioxidante, imunomoduladora e antimicrobiana por diferentes mecanismos e vias bioquímicas (SILVA; CASAROTTI; PENNA, 2023).

Nosso grupo desenvolveu duas bebidas mistas probióticas com frutos que possuem características relevantes para a indústria de alimentos funcionais, compostos bioativos diversos

e significativa importância econômica regional: babaçu, buriti e caju (MADEIRA, 2024). O babaçu (*Attalea speciosa* Mart. ex. Spreng.) é uma palmeira da região de transição amazônica de importância econômica e cultural para a população regional (BARROQUEIRO et al., 2016). O extrato hidrossolúvel do coco babaçu, apresenta potencial econômico elevado e é rico em ácidos graxos, carboidratos e fibras, se caracterizando como um bom substrato para o crescimento de probióticos (CARNEIRO et al., 2014).

O buriti (*Mauritia flexuosa* L.f.) é nutritivo, tem alta concentração de compostos fenólicos, carotenoides e significativa atividade antioxidante (BENSAADA; SOTO-GARCIA; CARMONA-HERNANDEZ, 2022). O fruto também apresenta características prebióticas, pois possui carboidratos não digeríveis que estimulam o crescimento de bactérias do ácido lático (BARBOZA et al., 2022). O caju (*Anacardium occidentale* L.) tem como fruto a castanha, amplamente consumida ao redor do mundo, e o pseudofruto caju, um subproduto que representa cerca de 90% da massa do fruto, é menos utilizado, porém possui grande potencial nutricional (PEREIRA; MACIEL; RODRIGUES, 2011). Ele é rico em compostos fenólicos, vitamina C, carotenóides, ácidos anacárdicos, taninos e açúcares redutores, o que favorece sua expressiva atividade antioxidante (SINGH et al., 2020), com evidências de atividade antimicrobiana (SILVA et al., 2021) e antibiofilme (DIAS-SOUZA et al., 2017).

Bebidas probióticas mistas de extratos do coco babaçu com buriti ou caju representam uma inovação através da combinação de seus compostos bioativos e a possibilidade de diferentes características sensoriais e funcionais (MADEIRA, 2024). O grupo de pesquisa investigou anteriormente o potencial imunomodulador *in vivo* de bebidas mistas probióticas de coco babaçu com buriti ou caju em modelo de infecção e obteve resultados positivos quanto a proteção e controle da inflamação através do tratamento prévio com a bebida em camundongos sépticos. Entretanto, há a necessidade de entender os mecanismos envolvidos nas respostas *in vivo* e os experimentos *in vitro* são uma opção viável para a investigação (DIAS, 2023).

Diante das evidências do potencial biológico dos probióticos e dos frutos mencionados, nossa hipótese é que as duas bebidas funcionais formuladas têm suas propriedades bioativas potencializadas após o processo de fermentação probiótica. Para comprovar esta hipótese, realizamos uma investigação das propriedades antioxidantes, antimicrobianas e imunomoduladora em ensaios *in vitro* antes e após a fermentação probiótica. A dissertação foi delineada em dois capítulos. O primeiro, em anexo, traz o artigo de revisão integrativa intitulado “Antioxidant and Antimicrobial Properties of Probiotics: Insights from In Vitro Assays”. Em seguida, no capítulo II expomos os resultados encontrados na comparação entre as bebidas mistas vegetais antes e após a fermentação acerca de suas propriedades bioativas.

2. OBJETIVO

- Caracterizar comparativamente as atividade imunomoduladora, antioxidante e antibacteriana de bebidas mistas probióticas de babaçu com buriti ou caju em ensaios *in vitro*, com base em uma revisão da literatura sobre bebidas probióticas vegetais.

2.1 Objetivos Específicos:

- Elaborar uma revisão sobre as evidências do potencial antioxidante e antimicrobiano de probióticos *in vitro*.
- Avaliar a citotoxicidade *in vitro* das bebidas mistas probióticas elaboradas com o extrato do coco babaçu e caju ou buriti;
- Investigar o efeito imunomodulador das bebidas mistas probióticas, a ativação dos macrófagos e o perfil de citocinas *in vitro*;
- Averiguar a atividade antioxidante das bebidas mistas probióticas;
- Observar se as bebidas mistas probióticas apresenta atividade antibacteriana nos testes *in vitro*.

3. REFERENCIAL TEÓRICO

3.1 Probióticos

A definição de probióticos mudou diversas vezes ao longo da história, conforme a ciência se aprofundou em estudos para desvendar os organismos responsáveis por processos de fermentação observados a milhares de anos (REID; GADIR; DHIR, 2019). A palavra probiótico deriva da junção dos termos *pro* do latim e do grego *bio*, e significa “para a vida”, cunhada pela primeira vez por Werner Kollath em 1953. Na época, o cientista ainda não havia definido os probióticos essencialmente como microrganismos, mas como “corpos ativos com funções essenciais para promover vários aspectos da saúde” (LATIF et al., 2023a). Entretanto, muito antes de serem nominados probióticos, diversos cientistas já estudavam os efeitos da fermentação em produtos lácteos e como, aparentemente, o consumo desses alimentos e dos microrganismos responsáveis tinha impacto na saúde e qualidade de vida (HE et al., 2023).

No início do século XX, o cientista russo Elie Metchnikoff, no instituto Pasteur, voltou sua pesquisa para avaliar os efeitos que os microrganismos fermentadores tinham na saúde humana (GASBARRINI; BONVICINI; GRAMENZI, 2016). O pesquisador associou o consumo de microrganismos fermentados ao aumento da longevidade da população rural búlgara. Dois anos antes de lançar sua hipótese, o *Bacillus bulgaricus*, hoje conhecido como *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *Bulgaricus*, havia sido descoberto no iogurte da região. Naquela época, Metchnikoff já havia associado que a presença desses microrganismos era capaz de desintoxicar o organismo de substâncias produzidas por outras bactérias, que ele chamou “*micróbios putrefativos*”, e defendeu o consumo de bactérias fermentadoras como forma de melhorar a saúde. Desde então, diversas pesquisas já demonstraram que o consumo de probióticos é, de fato, capaz de trazer benefícios que remontam as hipóteses de Metchnikoff (OZEN; DINLEYICI, 2015).

As definições para probióticos foram ampliadas por Lilly e Stillwell em 1965 como “substâncias secretadas por um organismo que estimulam o crescimento de outro” (GASBARRINI; BONVICINI; GRAMENZI, 2016). Esta definição, no entanto, está mais associada aos metabólitos dos probióticos do que ao microrganismo em si. Em 1989 Fuller e em seguida Haveenar e In't Veld em 1992, alegaram que a presença do microrganismo vivo era imperativa para alcançar os benefícios associados aos probióticos (ZENDEBOODI et al., 2020). Foi somente em 2001 que a Organização das Nações Unidas para Agricultura e Alimentação (FAO) e a Organização Mundial da Saúde (OMS) definiram o termo probiótico

como “micro-organismos vivos que, quando administrados em quantidades adequadas, conferem um benefício à saúde do hospedeiro”, definição reafirmada no painel promovido em 2014 e ainda vigente (HILL et al., 2014).

O painel de 2014 da FAO/OMS ilustrou as características necessárias para que um microrganismo seja considerado probiótico, dentre os quais "As cepas devem ser identificadas geneticamente, classificadas usando a terminologia mais recente e designadas por números, letras ou nomes e " Estudos adequadamente dimensionados e projetados devem ser realizados para designar uma cepa como probiótica e usar a(s) cepa(s) no hospedeiro ao qual os probióticos se destinam (humano, gado, animal de companhia, etc.)." apontam a necessidade de estudos aprofundados para eleger um novo microrganismo probiótico. Fatores como segurança e eficácia são indispensáveis para a inserção de uma nova cepa no mercado (REID; GADIR; DHIR, 2019).

A definição do termo probiótico destaca a importância da viabilidade do microrganismo em um produto para que os benefícios alegados sejam alcançados. A Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) regulamenta a comercialização de produtos alimentícios contendo probióticos no Brasil. As resoluções vigentes, como a Resolução de diretoria Colegiada (RDC) Nº 2, de 7 de janeiro de 2002 que dispõe sobre Substâncias bioativas e Probióticos isolados com alegação de propriedades funcional e ou de saúde, ou a RDC nº 241, de 26 de julho de 2018 que estabelece os requisitos para comprovação da segurança e dos benefícios à saúde dos probióticos para uso em alimentos, não especificam em seus textos uma quantidade mínima necessária de microrganismos em alimentos para ser considerado probiótico, porém exige que haja uma quantidade mínima de microrganismos vivos nos produtos para garantir os benefícios e alegações de saúde sugeridos (BRASIL, 2002; BRASIL 2018).

A quantidade de microrganismos vivos presentes em alimentos probióticos está diretamente relacionada a sua bioacessibilidade e, portanto, aos benefícios associados a eles (CHUA et al., 2020). O Ministério da Saúde italiano preconiza a necessidade de alimentos alegadamente probióticos de terem no mínimo 10^9 UFC de bactérias por porção diária (ITALIA, 2013), quantidade também adotada pela agência de saúde canadense (CANADÁ, 2009). Já a FDA (do inglês *Food and Drug Administration*) agência que regulamenta o uso de probióticos nos Estados Unidos, impõe a quantidade mínima de 10^7 UFC/g de microrganismos em produtos probióticos no momento da fabricação e 10^6 UFC/g ao longo de todo o tempo de prateleira (USA, 2024). Esses valores se baseiam em diversos estudos que apontam a necessidade de consumo diário de 10^8 a 10^9 de probióticos para que as propriedades funcionais e alegações de saúde sejam significativas (MARTA; SAAD; SAAD, 2006).

A segurança no consumo de probióticos, também é considerada tópico importante pelas agências reguladoras. A maior parte das cepas probióticas registradas de acordo com os critérios da FAO/OMS são consideradas GRAS (do inglês *Generally Regarded As Safe*) por não apresentarem potencial de risco para a saúde após consumo (ZAWISTOWSKA-ROJEK; TYSKI, 2018), pois passam por um minucioso processo de caracterização, sequenciamento do genoma e identificação a nível de cepa, utilização de dados históricos com estudos anteriores realizados com o microrganismo e ao menos um ensaio clínico em humanos. Esses dados são importantes para rastrear fatores de risco que podem estar associados ao consumo de microrganismos vivos, como fatores de virulência ou ainda a presença de genes de resistência antimicrobiana que podem ser transferidos para bactérias potencialmente patogênicas presentes na microbiota intestinal (BINDA et al., 2020).

A maioria dos probióticos no mercado são bactérias produtoras de ácido láctico (BAL), geralmente encontradas na microbiota humana, das quais, os gêneros *Lactobacillus* e *Bifidobacterium* se destacam como os mais comuns entre os probióticos (BUSTOS et al., 2024). Estes microrganismos têm sido empregados em diversos produtos probióticos, ambas são historicamente seguras, tem a capacidade de colonizar o intestino humano, produzem metabólitos essenciais como ácidos graxos de cadeia curta e vitaminas, bem como diversos outros benefícios que variam entre gênero, espécie e cepa (TOURET, OLIVEIRA, SEMEDO-LEMSADDEK, 2018).

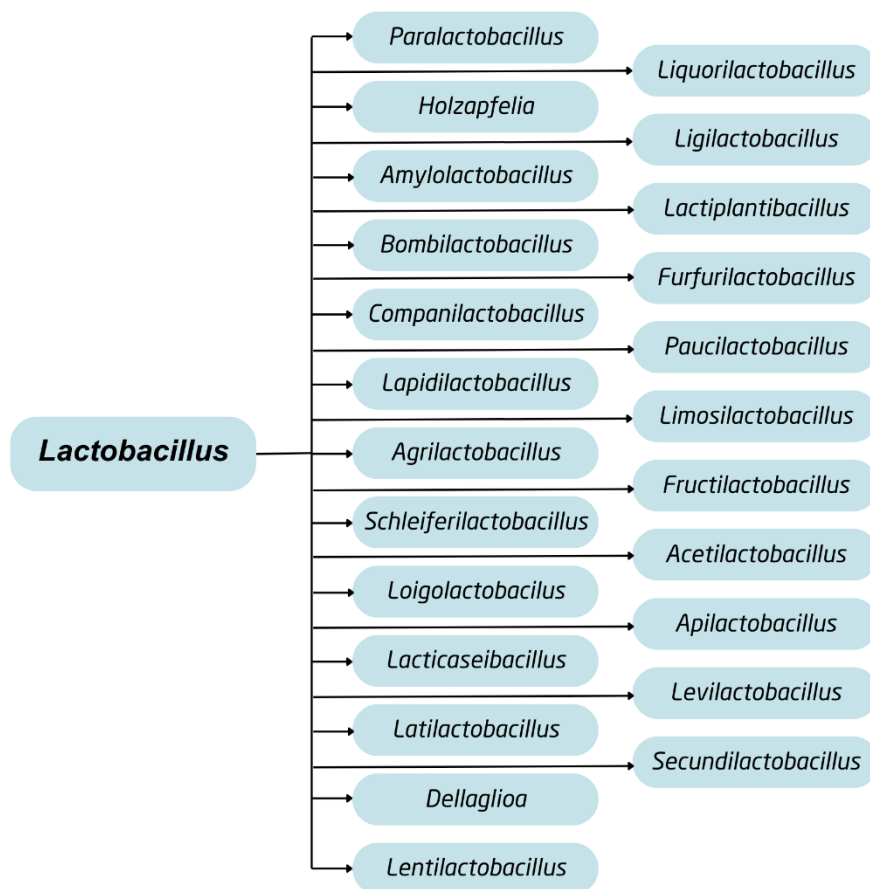
O gênero *Bifidobacterium* é composto por bactérias Gram-positivas anaeróbicas não patogênicas geralmente encontradas em condições normais do intestino humano (WESTERMANN et al., 2016). Apesar de apresentarem diversas características interessantes a probióticos, como a adesão ao epitélio intestinal, produção de ácidos graxos de cadeia curta (AGCC) e interação imunológica, são menos utilizadas em comparação aos *Lactobacillus* em mercados mais extensos. Essas bactérias crescem mais lentamente, são mais exigentes com a presença do oxigênio e exibem longo tempo de fermentação (JENA; CHOUDHURY, 2023). Além destes dois gêneros, *Pediococcus*, *Lactococcus*, *Enterococcus*, *Streptococcus*, são outros com cepas probióticas (LATIF et al., 2023b).

O gênero *Lactobacillus* é composto por bactérias Gram-positivas, anaeróbicas facultativas não formadoras de esporos, e engloba grande parte das bactérias comercialmente usadas na indústria de probióticos (OJHA; SHAH; MISHRA, 2021). Estas bactérias têm afinidade pela mucosa intestinal, produzem diversos metabólitos benéficos como riboflavina, folato, cobalamina e AGCC (HATI et al., 2019) e contribuem para a manutenção da integridade da barreira epitelial (LATIF et al., 2023b). Presentes há milhares de anos nos processos

fermentativos de derivados lácteos, o histórico e o acúmulo de dados acerca de sua presença em produtos fermentados contribuem para atestar a segurança e eficácia associadas ao gênero (ZHANG et al., 2018).

Mais de 200 espécies compunham o gênero *Lactobacillus*, com uma diversidade de genomas e outros gêneros associados em complexos (*Pediococcus*, *Leuconostoc*, *Weissella*, *Oenococcus* e *Fructobacillus*) tornando esta, uma das maiores famílias bacterianas até então (WITTOUCK et al., 2019). Em março de 2020 Zheng et al., 2020 publicaram uma atualização da taxonomia do gênero *Lactobacillus*, criando 23 novos gêneros dentro da família *Lactobacillaceae* a fim de distribuir as espécies bacterianas de forma mais homogênea respeitando padrões filogenéticos, ecológicos e metabólicos comuns às espécies realocadas. A figura 1, ilustra a atualização dos gêneros de *Lactobacillus*.

Figura 1 – Lista dos novos gêneros de *Lactobacillus* após atualização de Zheng et al., 2020.



Fonte: Elaborado pelo autor (adaptado de Zheng et al., 2020)

3.2 Relação com a microbiota

Durante o trânsito gastrointestinal os probióticos podem sofrer pelo processo de digestão e contato com ácidos estomacais, biliares, estresse osmótico e a adaptação ao ambiente hostil (BUSTOS et al., 2024). As bactérias comensais autóctones (nativas) do trato gastrointestinal (TGI) desenvolveram diversos mecanismos de resistências as condições do ambiente intestinal, e interagem de forma benéfica com o sistema imunológico (GROUSSIN; MAZEL; ALM, 2020). Estudos recentes apontaram uma relação intrínseca entre a imunoglobulina A (IgA), presente principalmente em mucosas, e a regulação das bactérias intestinais comensais, sendo sua ausência fator determinante para o controle da proliferação de microrganismos potencialmente prejudiciais à saúde humana (TAKEUCHI; OHNO, 2022). Durante o processo de fabricação das cepas probióticas, as colônias *starter* são submetidas a estresses semelhantes para que desenvolvam mecanismos de resistência e sejam capazes de sobreviver no TGI (FENSTER et al., 2019).

O consumo de microrganismos vivos pressupõe benefícios que vão além dos metabólitos presentes no fermentado, a suplementação probiótica visa um repovoamento da microbiota intestinal com células potencialmente benéficas ao hospedeiro (ZOMMITI; FEUILLOLEY; CONNIL, 2020). O processo da adesão das bactérias probióticas envolve fatores relacionados a cepa usada, a mucosa intestinal e à microbiota residente. As células epiteliais intestinais estão em grande parte recobertas por uma camada viscosa de muco (mucina). A presença de açúcares ligados a proteínas que formam essa substância pode interagir com receptores presentes nas membranas das bactérias probióticas, como proteínas associadas à camada de superfície (SLAPs) ou proteínas de ligação à mucina (Mubs), observadas em diversas espécies dos gêneros *Bifidiobacterium* e *Lactobacillus*. A hidrofobicidade e outras proteínas, além dos presentes na mucina, também estão relacionados ao processo de adesão dos probióticos a parede celular intestinal (MONTEAGUDO-MERA et al., 2019).

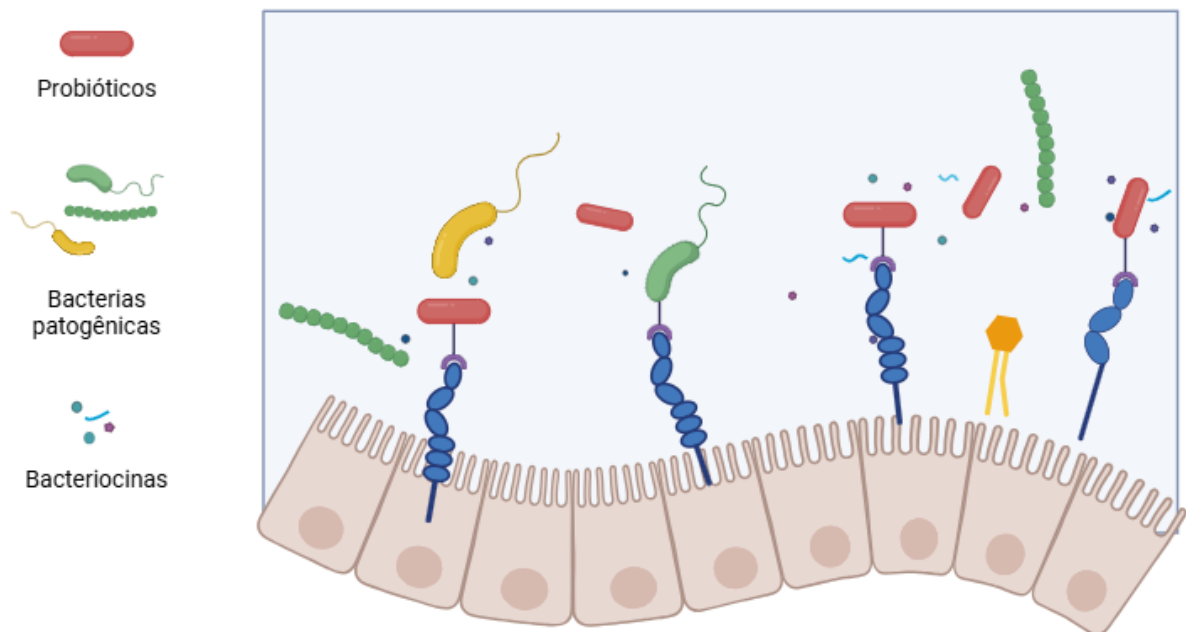
A composição da microbiota intestinal é altamente influenciada pela dieta do hospedeiro (FLINT; DUNCAN; LOUIS, 2017). Microrganismos que se aderem a parede intestinal e ao muco são classificados como microbiota parietal, enquanto os que compõe os alimentos em trânsito ou o bolo fecal são chamados de microbiota luminal (ARROYO et al., 2020). A microbiota luminal é especialmente afetada pelo tratamento com probióticos, Tannock et al., (2000) observaram *Lactobacillus rhamnosus* DR20 se tornar dominante nas fezes de 60% dos

indivíduos tratados com o microrganismo durante o período de tratamento. Ainda que neste estágio seja de caráter transitório, esses microrganismos afetam o metabolismo de carboidratos e butirato (WIEËRS et al., 2020). Estudos mostram que ainda que não aderida, algumas cepas probióticas exibem a capacidade de secretar substâncias que inibem a ligação de bactérias patogênicas a estruturas de ligação expressas em células epiteliais, o que aponta sua eficácia competitiva (FUJIWARA et al., 1997).

A microbiota intestinal é formada por uma diversidade de bactérias, fungos e vírus que colonizam o intestino de forma comensal majoritariamente, ou seja, em uma relação de benefício mútuo (COATES et al., 2019). Esse complexo ecossistema desempenha diversos papéis fundamentais no metabolismo humano, participam da maturação do sistema imune, são responsáveis pela produção de biomoléculas essenciais, além de auxiliar na digestão de certos nutrientes (ROLHION; CHASSAING, 2016). Entretanto, dentre a imensa variedade de bactérias presentes no TGI, existem aquelas que, em condições adversas, podem adquirir características virulentas e se tornarem patogênicas (NAGAO-KITAMOTO et al., 2016). Esse é um cenário particularmente comum quando há um desequilíbrio na composição da microbiota intestinal, com a maior concentração de bactérias potencialmente patogênicas e menor quantidade de probióticos, sejam eles nativos ou oriundos de suplementação. Esse desequilíbrio é chamado de disbiose (NEUHANNIG et al., 2019).

Quando aderidos à parede intestinal, os probióticos são capazes de competir com outros microrganismos, especialmente aqueles com potencial patogênico, por espaços e recursos (HE et al., 2023). Cepas com capacidade de adesão à moléculas expressas na mucosa bloqueiam sítios de adesão usados por patógenos e secretam substâncias antimicrobianas (MONTEAGUDO-MERA et al., 2019). Ao se aderirem a mucosa intestinal, os probióticos interferem no processo de fixação, colonização, e infecção de patógenos. Diversas cepas de lactobacilos e bifidobactérias compartilham moléculas de adesão ao epitélio com *Salmonella choleraesuis* enteropatogênica, sendo os probióticos capazes de inibir e deslocar o patógeno do sítio de ligação (VAN ZYL; DEANE; DICKS, 2020). Um ensaio de competição realizado entre cepas probióticas e patogênicas demonstrou que o número de células de biofilme de *Listeria monocytogenes* KACC 12671 foi significativamente menor quando co-cultivado com *Lactobacillus paracasei* KACC 12427 e *Lactobacillus rhamnosus* KACC 11953, o que aponta a capacidade de inibição do metabolismo patogênico quando em cultura compartilhada com probióticos (WOO; AHN, 2013). A Figura 2 ilustra o processo de exclusão competitiva entre probióticos e patógenos.

Figura 2 – Representação das ações antagonísticas entre probióticos e bactérias patogênicas. Ao se ligarem a moléculas expressas pelo epitélio, os probióticos impedem a fixação e infecção por outros microrganismos, além de secretarem substâncias que inibem a adesão de patógenos.

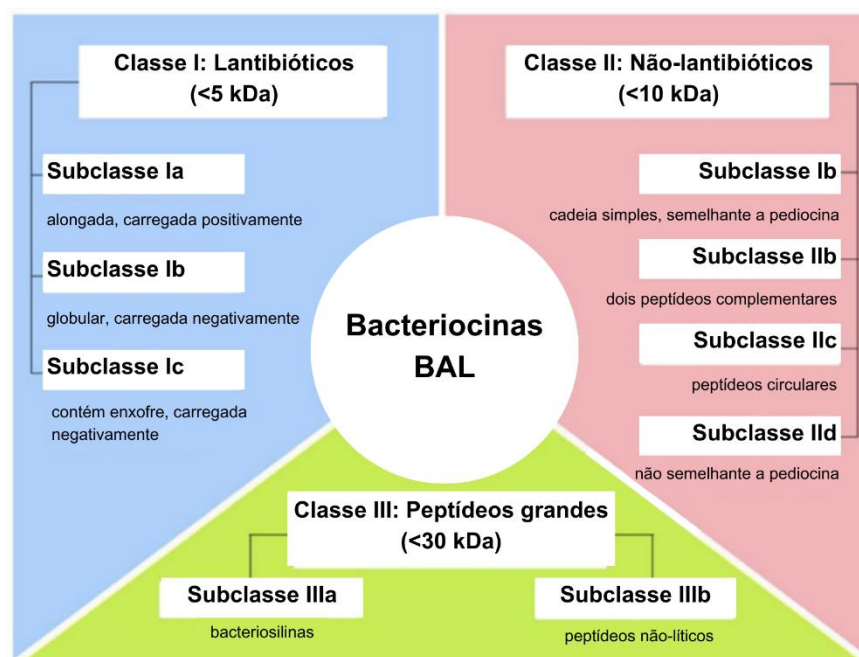


Fonte: Elaborado pelo autor (2025).

Outro mecanismo usado, predominantemente, pelas bactérias produtoras de ácido láctico contra patógenos é a secreção de moléculas antimicrobianas (THODA; TOURAKI, 2023). As bacteriocinas são peptídeos de variado tamanho e peso molecular que atuam inibindo bactérias em espectros amplo, como a bacteriocina produzida por *Bacillus amyloliquefaciens* RX7 que também é antifúngica, ou restrito, como a bifidocina B, produzida por *Bifidobacterium bifidum* NCFB (VAN ZYL; DEANE; DICKS, 2020). Os microrganismos produtores dessas moléculas, geralmente bactérias, desenvolvem mecanismos de autodefesa para não sofrerem com os efeitos de seu metabólito (THODA; TOURAKI, 2023a). Estudos demonstram que tanto o consumo de bacteriocinas quanto da bactéria produtora são eficazes para o controle de microrganismos sensíveis a sua ação, bem como sua utilização tem sido avaliada para além do TGI, em infecções cutâneas e orais (VAN ZYL; DEANE; DICKS, 2020).

As três principais classes de bacteriocinas produzidas por BAL são definidas por características ligadas à sua bioatividade e mecanismo de ação, como tamanho, estrutura e composição bioquímica. A classe I das bacteriocinas é chamada de lantibióticos, composta pelos menores peptídeos entre essas moléculas, com tamanho inferior a 5 kDa. Seu principal mecanismo de ação é a formação de poros na membrana bacteriana através da ligação com o lipídio II. A segunda classe de bacteriocinas é formada por peptídeos de até 10 kDa, elas atuam alterando a permeabilidade da membrana bacteriana através da formação de canais. As bacteriocinas de classe III englobam os maiores peptídeos, com 30 kDa que agem através de sua atividade enzimática, desestabilizando a integridade da parede celular bacteriana (SOLTANI et al., 2021; THODA; TOURAKI, 2023a). A figura 3 traz um esquema com as principais classes de bacteriocinas.

Figura 3 – Classes de bacteriocinas produzidas por bactérias produtoras de ácido láctico.



Fonte: THODA; TOURAKI, 2023 (adaptado para o português)

Além de atividade antimicrobiana direta, há evidências de que bacteriocinas podem atuar influenciando o sistema imune (BENÍTEZ-CHAO et al., 2021). A nisina, um lantibiótico, já

demonstrou efeitos imunomodulatórios significativos, tanto para a proliferação de células do sistema imune como TCD4+ e CD8+, secreção de quimicinas como MCP-1, IL-8 e supressão da secreção de fator de necrose tumoral alfa (TNF- α), até a ativação de armadilhas extracelulares de neutrófilos (NETs) *in vitro* (THODA; TOURAKI, 2023a).

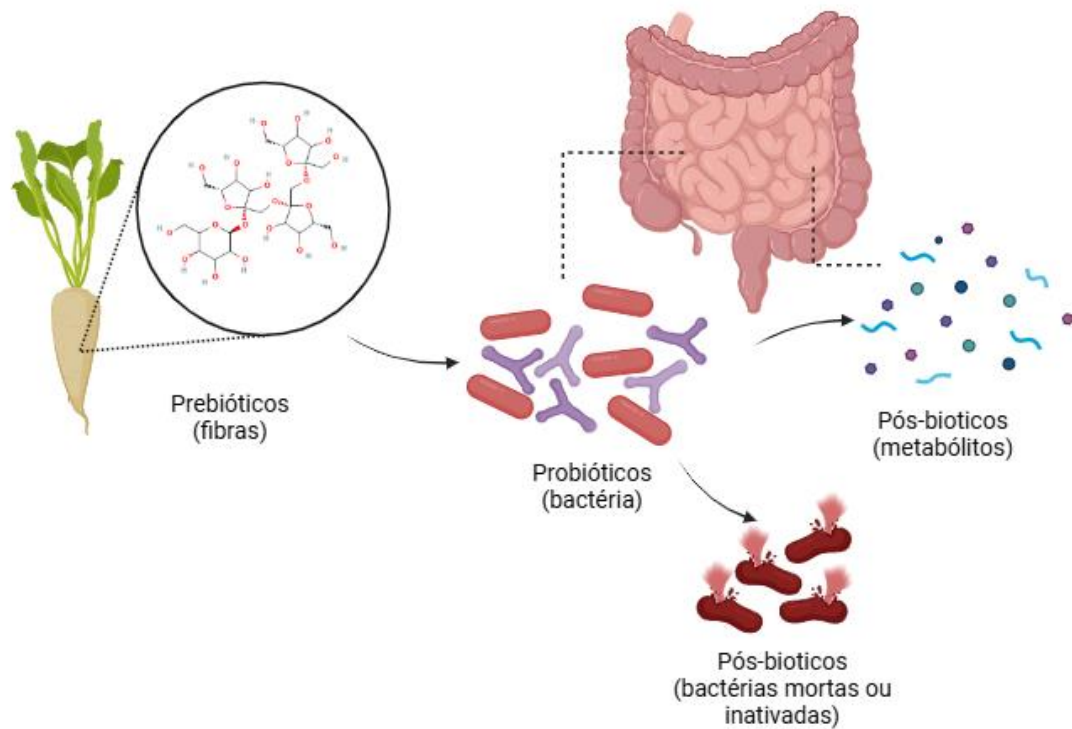
A colonização do intestino por probióticos favorece a interação com o sistema imunológico em diferentes aspectos. A ingestão de probióticos já demonstrou capacidade de estimular células da imunidade inata como macrófagos, e células natural *killers* (NK). Além disso, esses microrganismos tem efeito significativo na produção de IgA no lúmen intestinal, e também são responsáveis pela inibição de TNF- α (VIAŞU-BOLOCAN; POPESCU; BICĂ, 2013). Probióticos também agem interferindo as vias de sinalização de NF- κ B e MAPK inibindo a produção de citocinas pró-inflamatórias que ao ativarem mecanismos de recrutamento de células e iniciar outras vias inflamatórias tendem a gerar sérios danos ao epitélio intestinal (VAN ZYL; DEANE; DICKS, 2020).

Os probióticos são frequentemente associados aos prebióticos, definidos como "ingrediente alimentar não digerível que afeta benéficamente o hospedeiro ao estimular seletivamente o crescimento e/ou atividade de uma ou de um número limitado de bactérias no intestino" (SCOTT et al., 2010). Geralmente são fibras, carboidratos oligossacarídeos derivados ou não de amido e glicose, frutanos, galacto-oligossacarídeos, oligossacarídeos não carboidratos entre outros. Estes nutrientes não são absorvidos pelo TGI e tem como propósito principal estimular o crescimento de probióticos (DAVANI-DAVARI et al., 2019). Além de substrato para os probióticos, alguns prebióticos podem agir diretamente como adjuvante na proteção contra microrganismos patogênicos. Oligossacarídeos presentes no leite materno humano e galacto-oligossacarídeos podem inibir a colonização do intestino, eles atuam se ligando as moléculas de adesão expressas pelos patógenos impedindo a fixação destes na mucosa (MONTEAGUDO-MERA et al., 2019).

Há ainda outra classe de substância que compõe o universo dos probióticos (Fig. 4), pós-bióticos, termo recentemente definido pela Associação Científica Internacional de Probióticos e Prebióticos (ISAPP do inglês *International Scientific Association for Probiotics and Prebiotics*) como "preparação de microrganismos inanimados e/ou seus componentes que confere um benefício à saúde do hospedeiro" (SALMINEN et al., 2021). Estes englobam células microbianas inativadas, componentes celulares de microrganismos probióticos e metabólitos que tenham ação factual para promoção da saúde. Evidências de que células mortas de probióticos tem efeitos benéficos, sobretudo imunomoduladores, tem se acumulado, elas vão desde a diminuição da produção de IL-8, à influência na adesão de patógenos ao epitélio

intestinal (ZENDEBOODI et al., 2020). Células probióticas mortas ou inativadas são frequentemente denominadas como “paraprobióticos” em diversas literaturas. Entretanto, o painel que definiu o termo pós-biótico não reconhece essa nomenclatura como oficial, mas o insere na categoria (SALMINEN et al., 2021). Os metabólitos e moléculas secretadas por microrganismos probióticos em geral, também se enquadram como pós-bióticos. Dentre eles se destacam, bacteriocinas, AGCCs, vitaminas, ácidos orgânicos, peptídeos, entre outros (HERNÁNDEZ-GRANADOS; FRANCO-ROBLES, 2020; ZENDEBOODI et al., 2020).

Figura 4 – Representação de prebióticos, probióticos e pós bióticos, sua fonte (prebióticos) ou sítio ativo (probióticos).



Fonte: Elaborado pelo autor (2025).

3.3 Probióticos e matrizes vegetais

Probióticos são geralmente classificados como suplementos alimentares, embora também sejam encontrados na forma de medicamentos (PASSARIELLO; AGRICOLE;

MALFERTHEINER, 2014). Produtos probióticos são uma classe importante de alimentos funcionais, alimentos que oferecem benefícios além da nutrição convencional para a promoção da saúde e prevenção contra doenças (KAUR; DAS, 2011). Como discutido anteriormente, os primeiros estudos com esses microrganismos observaram suas propriedades através da fermentação de alimentos, sobretudo laticínios. Esta relação permanece até os dias atuais, onde probióticos ainda são tradicionalmente associados a produtos lácteos como iogurtes e leites fermentados (COSTA et al., 2024). Em 1996, quando as definições do termo probiótico ainda estavam em debate, Salminen, (1996) definiu probióticos como "microrganismo viável inoculado em produtos lácteos que conferem saúde e nutrição ao hospedeiro". Embora na época a maioria dos estudos com BAL associassem essas bactérias a laticínios, conforme a pesquisa no campo evoluiu, a presença de microrganismos viáveis em matrizes não lácteas foi observada e passou a ser explorada (ZENDEBOODI et al., 2020).

Embora o leite seja adequado para a fermentação e inoculação de probióticos, a demanda crescente por opções de produtos não lácteos destaca a necessidade de novas matrizes para carrear esses microrganismos (ASPRI; PAPADEMÁS; TSALTAS, 2020). A demanda por alternativas não lácteas é multifatorial, religião, preocupações relacionadas a mudanças climáticas e manejo adequado de animais para a produção de alimento são alguns dos principais fatores socioculturais que influenciam a adesão de dietas veganas e vegetarianas, além destes, intolerância a lactose e alergia a proteína do leite também são razões para evitação ao consumo de leite e derivados (KATOCH et al., 2022; MATHIEU; DORARD, 2016).

Estimativas apontam um crescimento de aproximadamente 1,7 milhões de adeptos a dieta vegana na União Europeia para o ano de 2033 (STATISTA, 2023). Na Alemanha 3% dos consumidores segue a dieta vegana, entre 2% e 4% da população de Brasil, China, México, EUA, e 10% dos indianos também seguem esta dieta (STATISTA, 2024a), enquanto 6% dos alemães e estadunidenses, 5% dos mexicanos, 2% dos brasileiros, e 26% da população indiana são vegetarianos (STATISTA, 2024b). Esses dados estão ilustrados e distribuídos na Figura 5. A demanda por produtos de origem vegetal tem se intensificado, não apenas pela necessidade direta da parcela da população que não consome leite e derivados, mas também para aqueles que buscam por opções mais saudáveis e sustentáveis de alimentos (GROSSMANN et al., 2021).

Figura 5 – Adeptos a dietas vegana e vegetariana ao redor do mundo de acordo com dados de pesquisas realizadas entre 2022 e 2024 pela Statista, plataforma global de levantamento de

dados sobre diferentes mercados.



Fonte: Elaborado pelo autor (2025).

Neste cenário, a utilização de matrizes diversas de origem vegetal para o carregamento de probióticos em diferentes tipos de alimentos tem se destacado (SUBHASHREE; KAVITA, 2019). Purês de frutas fermentadas, leite de soja fermentado, kefir de soja, e bebidas probióticas a base de frutas são algumas das variantes entre o leite fermentado ou iogurte tradicional (DE ASSIS et al., 2021b; PANGHAL et al., 2018). Entre os produtos probióticos, as bebidas fermentadas se destacam, no mercado de alternativas lácteas que movimentou mais de 13 milhões de dólares em 2018, esse segmento ganha tração. A fermentação da matriz vegetal confere características nutricionais importantes as bebidas vegetais sugeridas como alternativas ao leite animal. Embora ricas em fitoquímicos com potencial antioxidante, anti-inflamatório e antimicrobiano, muitas dessas bebidas tem componentes antinutrientes que interferem no processo de absorção de minerais como ferro (Fe), Cálcio (Ca), Zinco (Zn), e certas vitaminas. Algumas saponinas que compõe a soja e a aveia formam complexos com proteínas e diminuem sua bioacessibilidade. A fermentação probiótica é capaz de biotransformar os componentes da matriz vegetal e torná-la mais nutritiva (RASIKA et al., 2021).

Embora a manutenção da viabilidade das BAL em matrizes vegetais possa representar um

desafio, uma vez que nem todas as leguminosas, grãos, nozes ou frutos são adequados para a sobrevivência e metabolismo desses microrganismos, a combinação algumas cepas e vegetais são capazes de produzier bebidas probióticas de origem vegetal, como é exposto na Tabela 1 (RASIKA et al., 2021). Além dos substitutos vegetais ao leite, algumas frutas também podem servir como matriz vegetal para a fermentação probiótica, agregando alto valor nutricional, compostos bioativos e variedade sensorial. Paiva et al., (2024) desenvolveram uma bebida probiótica a base de coco, manga e inhame que conservou a viabilidade do probiótico inoculado dentro dos padrões preconizados sobre quantidade de microrganismos. Pereira et al., (2017) também obtiveram sucesso ao formular uma bebida probiótica de cupuaçu que além de manter a viabilidade dos probióticos, teve boa aceitação sensorial e melhorou a atividade antioxidante após a fermentação. Estes dois casos trazem perspectivas para favoráveis para a busca por outras opções de matrizes para a fermentação probiótica.

Tabela 1 – Viabilidade probiótica em diferentes matrizes vegetais não lácteas.

Tipo de produto	Produto	Cepa probiótica	Condições de fermentação	Viabilidade no final da fermentação/início da armazenagem a frio	Viabilidade no final do armazenamento
À base de grãos	Bebida à base de milho	<i>Lb. paracasei</i> LBC-81 em co-cultura com <i>S. cerevisiae</i> CCM A 0731 ou <i>S. cerevisiae</i> CCM A 0732	37°C por 24 horas	10 ⁷ –10 ⁸ ufc/mL	>10 ⁶ ufc/mL
	Bebida simbiótica produzida a partir de malte de riceberry	<i>Lb. plantarum</i> TC24	37°C por 48 horas	10 ⁸ -10 ¹⁰ ufc/mL	10 ⁹ ufc/mL

Tipo de produto	Produto	Cepa probiótica	Condições de fermentação	Viabilidade no final da fermentação/início da armazenagem a frio	Viabilidade no final do armazenamento
	Bebida láctea de aveia não láctea com sabor a especiarias e morango	<i>Lb. plantarum</i> micro encapsulado	Não informado	Não informado	$>10^8$ ufc/mL
	Bebida simbiótica à base de aveia	<i>Lb. plantarum</i>	30°C por 12 horas	Não informado	$>10^7$ ufc/g
	Bebida de leite de arroz probiótica com sabor de frutas	<i>Lb. acidophilus</i> <i>B. bifidum</i> BB-1 <i>St. thermophilus</i> em cocultura	37°C por 16 horas	$10^9 - 10^{10}$ ufc/mL $10^9 - 10^{10}$ ufc/mL $10^8 - 10^{10}$ ufc/mL	$>10^8$ ufc/mL
Baseado em pseudocereais	Bebida de quinoa	<i>Lb. plantarum</i> DSM 9843	30°C por 2 dias	$10^{10} - 10^{11}$ ufc/mL	$\sim 10^7$ ufc/mL
	Bebida de iogurte de quinoa	<i>Lb. casei</i> Zhang e <i>Lb. casei</i> SY13	8 horas a 42°C		
	Bebida probiótica de quinoa	Uma mistura de <i>Bifidobacterium</i> sp., <i>Lb. acidophilus</i> e <i>St.</i>	37°C por 6 horas	$10^6 - 10^7$ ufc/mL	$>10^6$ ufc/mL

Tipo de produto	Produto	Cepa probiótica	Condições de fermentação	Viabilidade no final da fermentação/início da armazenagem a frio	Viabilidade no final do armazenamento
<i>thermophilus</i>					
À base de leguminosas	Bebida de grão de bico e coco	<i>Lb. paracasei</i> subsp. <i>paracasei</i> i LBC 81	37°C até atingir pH 4,6–4,8	$>10^8$ ufc/mL	$>10^8$ ufc/mL
	Bebida mista à base de soja	<i>Lb. rhamnosus</i> GG	37°C por 72 horas	$\sim 10^9$ ufc/mL	$>10^7$ ufc/mL
	Bebida mista à base de amendoim	<i>Lb. rhamnosus</i> GG	37°C por 72 horas	$>10^9$ ufc/mL	$>10^7$ ufc/mL
	Bebida fermentada da simbiótica de	<i>Lb. acidophilus</i> La-5 <i>B. animalis</i> subsp. <i>lactis</i> Bb-12 <i>S. thermophilus</i> em cocultura	37°C até o pH atingir 4,7–4,8	Não informado	$\sim 10^6$ ufc/mL $>10^8$ ufc/mL 10^7 - 10^8 ufc/mL
	Bebida de soja	<i>Lactococcus</i> , <i>Lactobacillus</i> e leveduras spp.	12 horas	$\sim 10^7$ ufc/mL	$>10^7$ ufc/mL
Baseado em nozes	Suco de castanha de caju 'Cerrado' clarificado	<i>Saccharomyces boulardii</i>	Os probióticos foram adicionados diretamente e armazenados a 7°C sem	10^8 ufc/mL	$>10^7$ ufc/mL

Tipo de produto	Produto	Cepa probiótica	Condições de fermentação	Viabilidade no final da fermentação/início da armazenagem a frio	Viabilidade no final do armazenamento
			uma etapa de fermentação separada		
	Leite de caju probiótico	<i>B. animalis</i> BB-12	Os probióticos foram adicionados diretamente e armazenados a 4°C sem uma etapa de fermentação separada	10^8 ufc/mL	$>10^8$ ufc/mL
	Iogurte probiótico de leite de amêndoa	<i>Lb. acidophilus</i> e <i>B. lactis</i> em combinação com fermentos de iogurte convencionais	Não informado	Não informado	$>10^7$ ufc/g

Lb. - Lactobacilos; S. - Saccharomyces; B. - Bifidobacterium; St. - Streptococcus

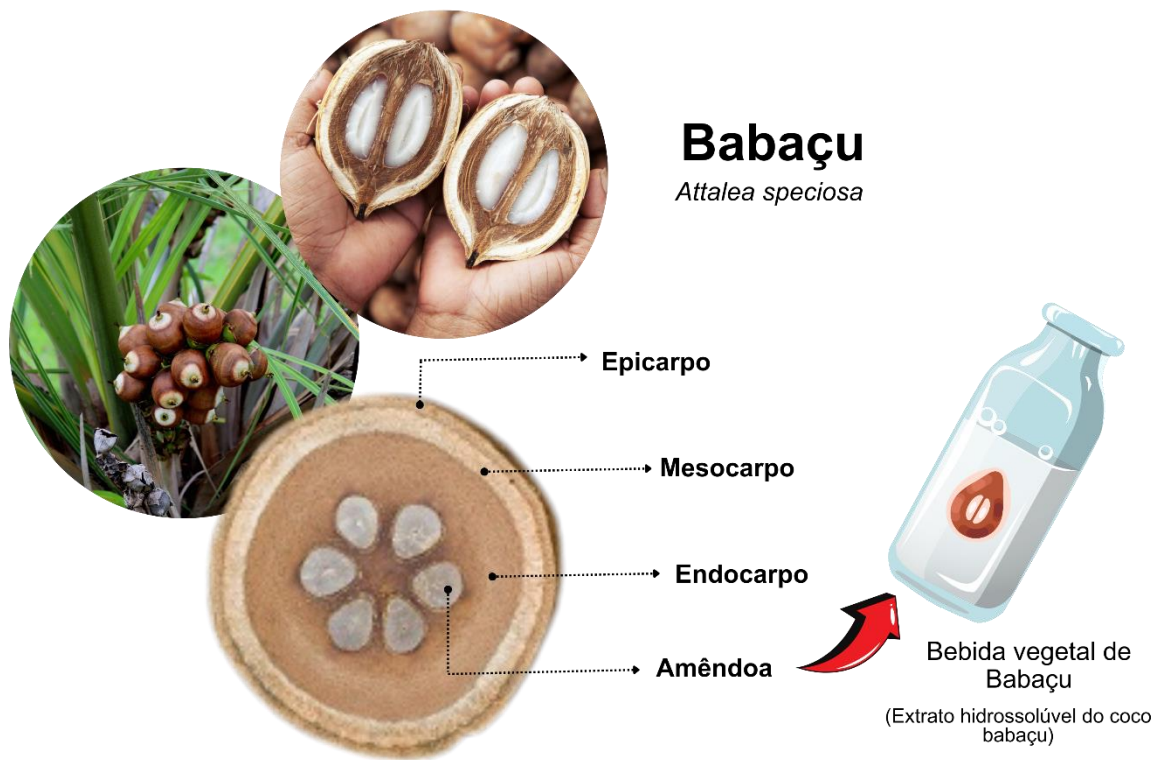
Fonte: adaptado de RASIKA et al., 2021

3.4 Babaçu

O babaçu (*Attalea speciosa* Mart. ex Spreng) é uma palmeira pertencente à família Aracacea, geralmente encontrada na zona de transição entre os biomas da Floresta Amazônica e o Cerrado, especialmente na região que engloba a Mata de Cocais, no norte e nordeste do Brasil (LIMA et al., 2020; PAIXÃO et al., 2019). Diversas partes da planta podem ser

aproveitadas em diferentes segmentos, coco babaçu é especialmente explorado para a extração do óleo refinado, e segue tendo grande contribuição na subsistência de muitas famílias, sobretudo nas comunidades de quebradeira de coco no estado do Maranhão, onde se estima que 80% das palmeiras se encontram, e cujo mercado emprega aproximadamente 300.00 pessoas (CARNEIRO et al., 2014).

Figura 6 – Babaçu (*Attalea speciosa* Mart. ex Spreng), representação do fruto, divisões e fonte do extrato hidrossolúvel do coco babaçu.



Fonte: Elaborado pelo autor (2025).

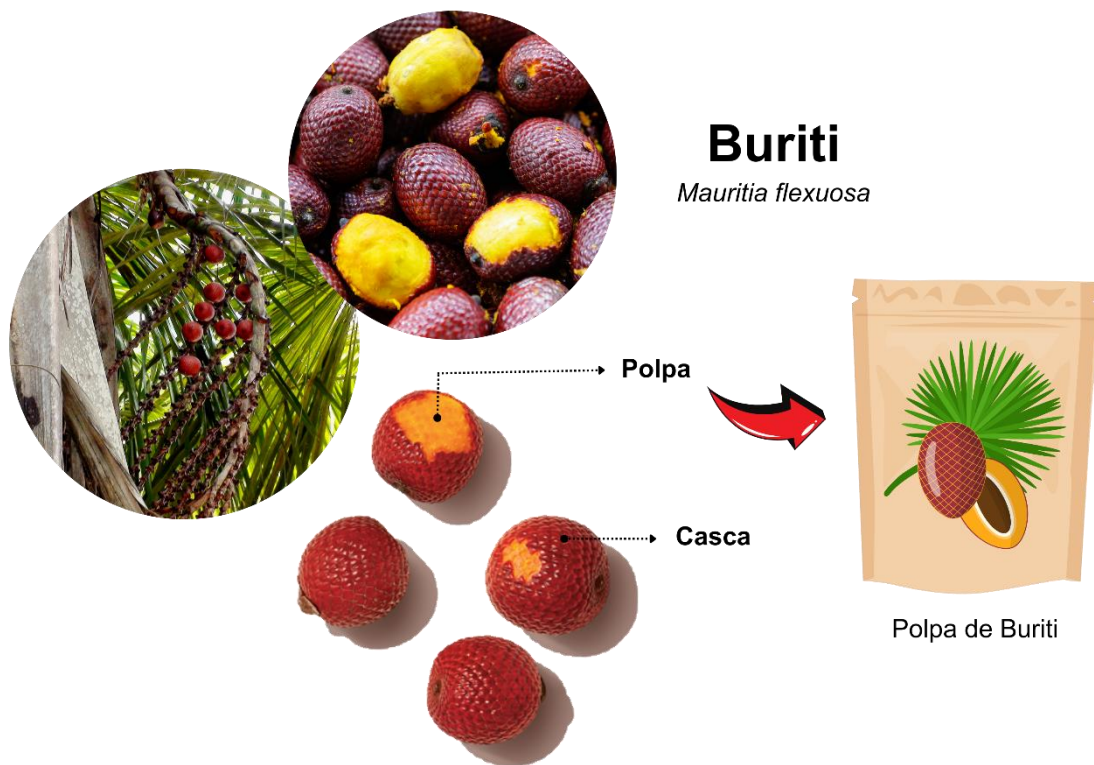
O coco babaçu possui epicarpo (11% da massa), mesocarpo (23%), endocarpo (59%), e amêndoa (7%). O óleo de coco babaçu é extraído a partir da amêndoa, é um dos principais produtos relacionado ao fruto (TEIXEIRA et al., 2018). Além do óleo, é possível produzir um tipo de "leite" vegetal a partir da amêndoa do coco babaçu. O extrato hidrossolúvel da amêndoa

é rico em ácidos graxos, carboidratos, fibras, compostos fenólicos como ácido elágico, ácido gálico, catequinas e epicatequinas. Sua baixa acidez é uma característica interessante ao crescimento de microrganismos de interesse industrial (CARNEIRO et al., 2014; HOLANDA et al., 2020).

3.5 Buriti

O buriti (*Mauritia flexuosa* L.f.) é uma palmeira da família Aracacea com ampla distribuição na região amazônica, e uma das mais numerosas no território brasileiro (MILANEZ et al., 2018). A versatilidade e o aproveitamento de diversas partes da planta destacam seu potencial econômico sustentável (AFONSO, 2011). O fruto é envolto por uma casca composta por escamas marrom-avermelhadas, sua polpa de coloração alaranjada é rica em nutrientes, como proteínas (entre 1,30% e 3,39% da massa da polpa) lipídios (18,16% a 51,67%) e carboidratos (25,53% a 31,24%). O buriti também é rico em fibras prebióticas, carboidratos não digeríveis que estimulam o crescimento de bactérias probióticas (BATISTA CARNEIRO; MELLO CARNEIRO, 2011; CURIMBABA et al., 2020).

Figura 7 – Buriti (*Mauritia flexuosa* L.f.), representação do fruto, suas partes e fonte da polpa usada na bebida mista.



Fonte: Elaborado pelo autor (2025).

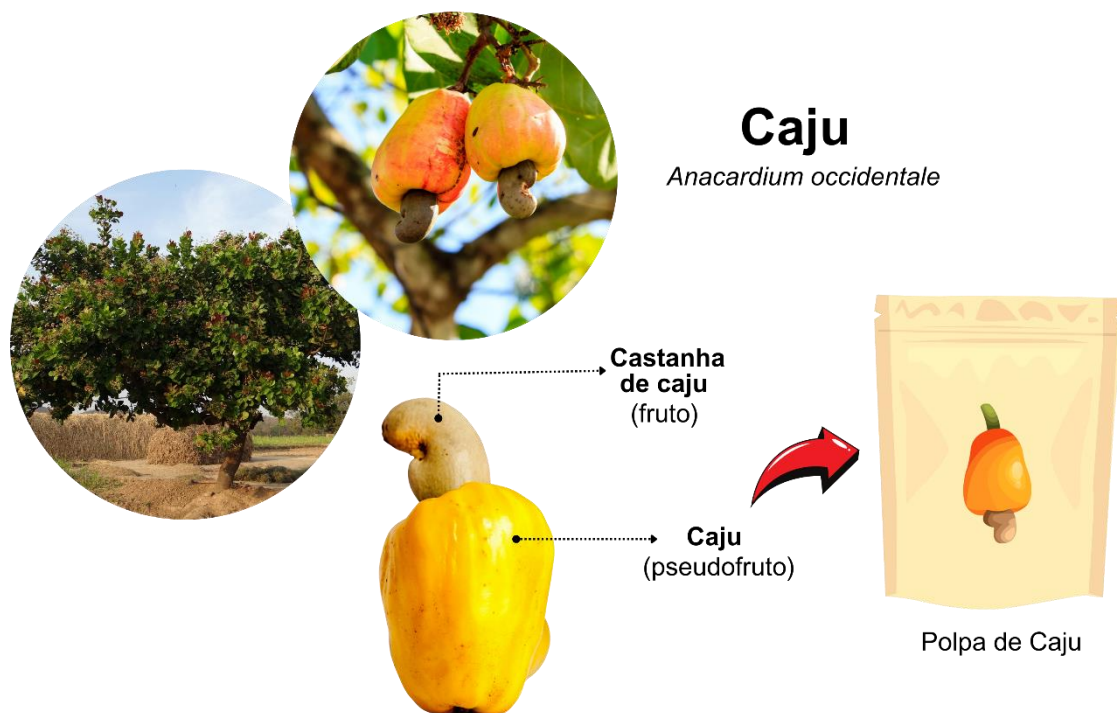
Sua polpa é rica em fenólicos como o ácido p-cumárico, ácido ferúlico, ácido cafeico, ácido protocatecuico, ácido clorogênico e flavonoides como catequina, epicatequina, apigenina, luteolina, miricetina kaempferol e quercetina (MILANEZ et al., 2018). Estudos com a polpa do buriti já demonstraram que o fruto possui atividade antioxidante e imunomoduladora, geralmente associado a seus bioativos, a capacidade de inibir radicais livres dos ácidos fenólicos e flavonoides de sua composição, bem como de suas fibras prebióticas de interagir com o sistema imunológico e seu consumo aumentar a produção de AGCC e a função da barreira epitelial intestinal (CURIMBABA et al., 2020)

3.6 Caju

O caju (*Anacardium occidentale* L.) é uma árvore da família Anacardiaceae,

originalmente nativa do Brasil, embora tenha sido exportada para outros países de clima semelhante como Vietnã e Índia, respectivamente os maiores produtores e processadores da castanha de caju na atualidade (DENDENA; CORSI, 2014). As diversas espécies do gênero *Anacardium*, todas nativas do Brasil, possuem fenótipos distintos que vão da variação de altura das árvores a acidez do pseudofruto (OLIVEIRA et al., 2020). O fruto do cajueiro é a castanha de caju, e o produto mais explorado da planta, é responsável por um mercado de alto padrão e crescimento constante (DENDENA; CORSI, 2014). O pedúnculo, pseudofruto do caju, representa cerca de 90% da massa do fruto (castanha e pedúnculo), é suculento, e popularmente conhecido como caju (PEREIRA; MACIEL; RODRIGUES, 2011).

Figura 8 – Caju (*Anacardium occidentale* L.), representação do fruto, árvore, suas partes e a fonte da polpa usada na bebida mista.



Fonte: Elaborado pelo autor (2025).

Embora represente grande parte da massa do fruto, seu mercado é bem menor do que da castanha, e é comumente comercializado na forma de polpa processada, uma vez que é rapidamente perecível. A polpa é rica em diversos bioativos, vitamina C, taninos, e teor mineral de cálcio e fósforo (OLIVEIRA et al., 2020). Rico em compostos antioxidantes, açúcares redutores e fibras, o caju possui alta capacidade de inibição de radicais livres e potencial como alimento funcional, além do maior aproveitamento de seu pedúnculo possibilitar uma exploração mais sustentável da planta (SINGH et al., 2019).

3.7 Fermentação de matrizes vegetais

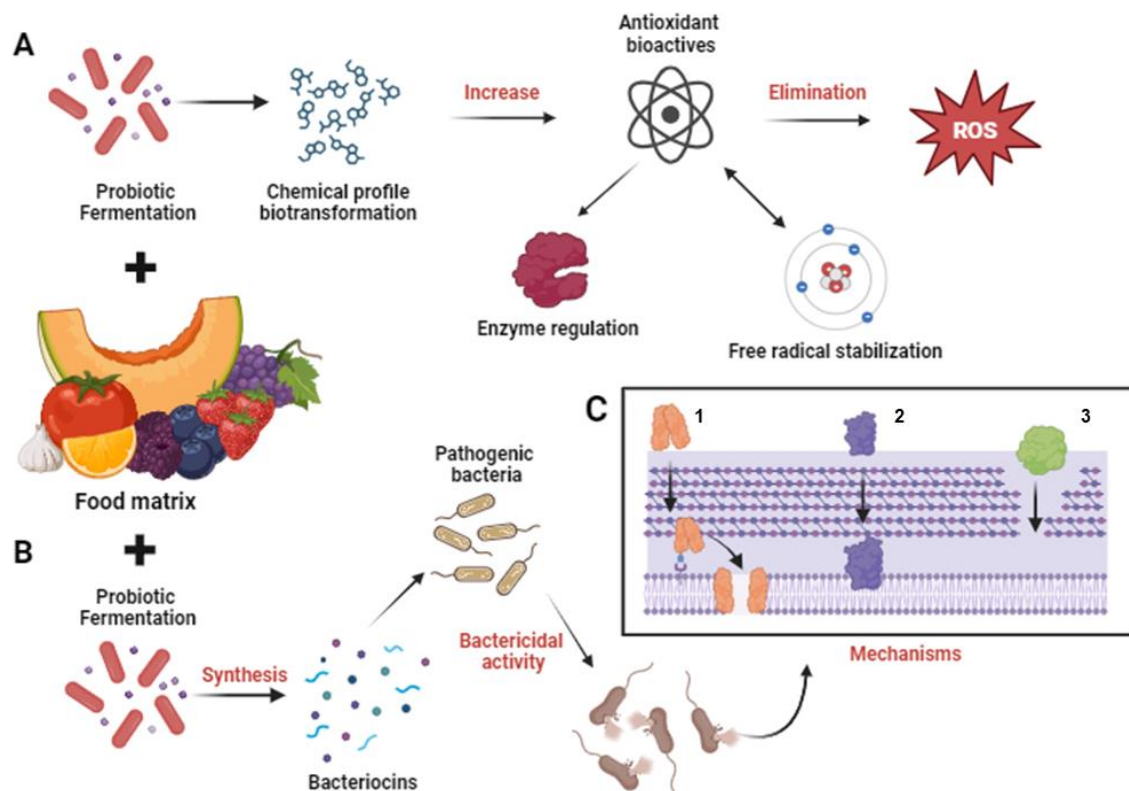
A fermentação é um processo metabólico realizado por certos microrganismos, fungos e bactérias majoritariamente, capaz de transformar a matriz utilizada durante seu processo de produção de energia através do substrato. Inicialmente este processo era usado para estabilizar e aumentar a vida útil de alimentos sensíveis as condições ambientais e perecíveis, como o leite, entretanto, com o tempo passou a ser usado para alterar características do material original, como a incorporação de álcool a bebidas (TEREFE, 2016). Os metabólitos primários produzidos pelos microrganismos geralmente variam com o tipo de microrganismo usado e a matriz vegetal. Álcool e dióxido de carbono são produzidos por leveduras, ácido acético por *Acetobacter*, ácido láctico por bactérias do ácido láctico, entre outros (MARCO et al., 2017).

O ácido láctico produzido pelas BAL agrega algumas das principais características das bebidas fermentadas, como o aroma e sabor ácido e fermentado, porém esse metabólito também exerce atividade antimicrobiana melhorando a conservação dos alimentos. Além do ácido láctico, na matriz vegetal os probióticos são capazes de metabolizar componentes das plantas, consumir carboidratos e gerar pós bióticos altamente funcionais (GUAN; XIONG; XIE, 2021). A biotransformação decorrente desse metabolismo melhora a bioacessibilidade de compostos fenólicos, que embora possuam diversas aplicações biológicas, são pouco absorvidos na alimentação tradicional (DE ASSIS et al., 2021a).

A melhora da bioacessibilidade pode ser observada no estudo de Voss. et al. (2021), onde o conteúdo de glicosídeos de isoflavonas da bebida de okara diminuiu após a fermentação enquanto as agliconas aumentaram. Essa mudança no perfil químico melhorou a bioacessibilidade uma vez que as agliconas são melhor absorvidas pelo organismo. Diversas frutas possuem componentes com capacidade bactericida em sua composição como compostos fenólicos, ácido salicílico, ácido cítrico, que atuam como adjuvantes aos mecanismos

antibacterianos dos probióticos ou servem como substrato metabólico no processo de produção de peptídeos bioativos (Figura 9) (ARBOS; STEVANI; CASTANHA, 2013).

Figura 9 – Impacto da fermentação nas atividades antioxidantes e antimicrobianas de probióticos em bebidas e alimentos fermentados. (A) melhora o perfil químico, o conteúdo de compostos bioativos, (B) produção de compostos bioativos antimicrobianos, como bacteriocinas, (C) mecanismos da atividade antimicrobiana: 1 - ligação à membrana celular bacteriana por meio de receptores compatíveis e formar poros; 2- desestabilização da carga iônica; (3) desestabilizar a membrana devido à sua carga destruição da parede celular do peptidoglicano.



Fonte: (COSTA et. al., 2024)

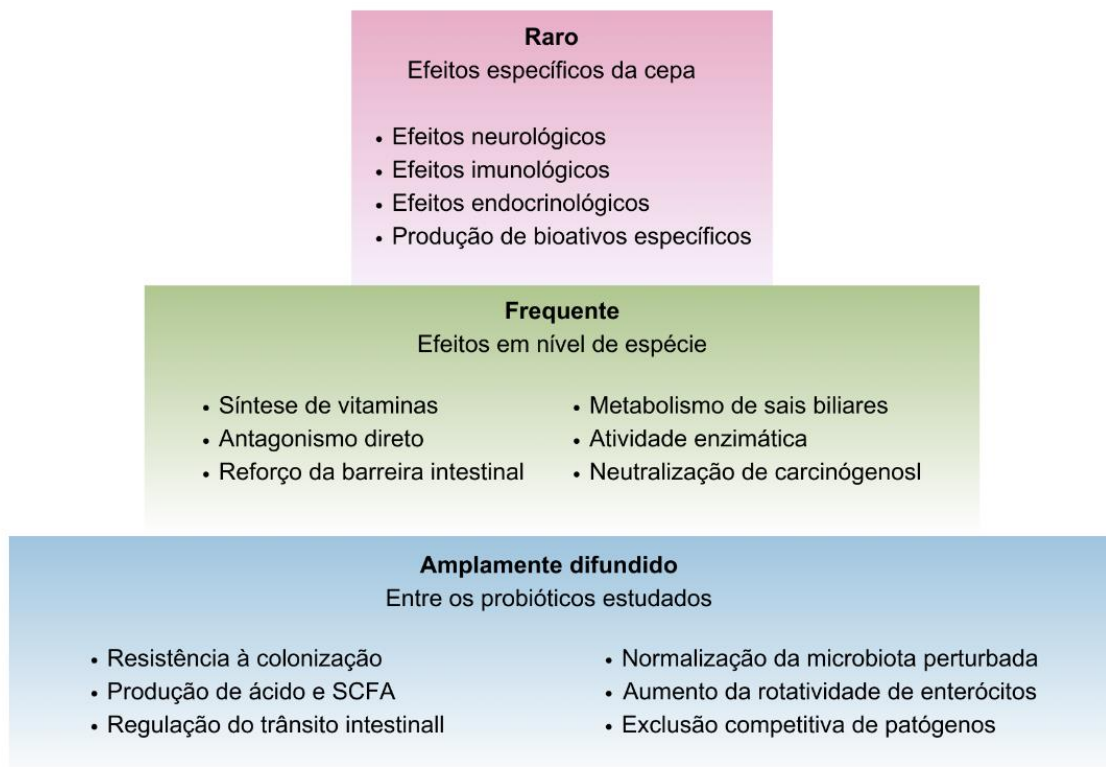
A matriz vegetal pode também atuar como um aliado na proteção dos probióticos durante o trânsito gastrointestinal (PRAMANIK; VENKATRAMAN; VAIDYANATHAN, 2023). Como apontado anteriormente, grande parte dos benefícios associados aos probióticos se baseiam em sua chegada e adesão ao ambiente intestinal. O caminho para chegar até este

ecossistema possui obstáculos como o suco gástrico e atividade enzimática. Um estudo com probióticos em sucos de romã, descreveu uma melhora na bioacessibilidade do fermentado após a digestão simulada (VALERO-CASES; NUNCIO-JÁUREGUI; FRUTOS, 2017). Outro estudo com uma bebida fermentada de melão e maçã durante a digestão simulada mostrou uma manutenção da atividade antioxidante no decorrer dos estágios (TANG et al., 2023). Esses resultados sugerem que a matriz vegetal fermentada pode proteger o probiótico durante a digestão e melhorar suas propriedades funcionais em seu sítio alvo.

3.8 Alegações de Saúde

Diversos benefícios associados aos probióticos já foram citados neste trabalho, entre os quais se destacam a colonização de bactérias comensais no intestino, prevenção de infecções, redução da inflamação intestinal e do risco de câncer de cólon, melhora na absorção de nutrientes e produção de vitaminas e ácidos graxos de cadeia curta (LATIF et al., 2023a). Os mecanismos associados a esses benefícios são variados, alguns inerentes a definição como probióticos, outros raros e altamente específicos para certas cepas (Figura 11) (HILL et al., 2014a).

Figura 10 – Classificação de mecanismos associados a probióticos.



Fonte: Hill et. al. 2014 (adaptado para o português)

Estes mecanismos por vezes podem parecer abstratos, entretanto, seus benefícios são refletidos quando o uso de probióticos é associado a profilaxia e tratamento de certas doenças.

Em sua meta-análise Ritchie e Romanuk sugeriram que o principal efeito benéfico dos probióticos está ligado a prevenção e tratamento de doenças gastrointestinais (RITCHIE; ROMANUK, 2012). Hipócrates, 2000 a.C disse “a morte está nas entranhas”. Quadros inflamatórios estão presentes em diversas doenças. O microambiente intestinal é particularmente suscetível a eventos inflamatórios devido a população de microrganismos e antígenos ali presentes, separados apenas por uma camada epitelial do ambiente estéril do corpo (ZMORA et al., 2017). Essa relação se baseia em um intrincado equilíbrio entre mecanismos pró e anti-inflamatórios, reconhecimento de padrões associados a patógenos (PAMPs), e tolerância antigênica adquirida pela interação de diversos fatores do sistema imune (ZMORA et al., 2017).

Diversas doenças crônicas não transmissíveis como diabetes e obesidade desencadeiam

uma inflamação constante e de baixo grau no ambiente intestinal, enquanto doença de Crohn e colite ulcerosa, que afetam diretamente o trato gastrointestinal (TGI) podem ser determinantes para o desenvolvimento de câncer colorretal (ULLMAN; GASTROENTEROLOGY; 2011; Furman et al., 2019). Pacientes com retocolite ulcerativa tratados com probióticos apresentam quadros atenuados da doença e previnem a recidiva através da inibição da ativação de NF- κ B e consequente diminuição de TNF-A e IL-1 β (CUI et al., 2004). Na doença de Crohn a suplementação probiótica reduz os níveis de citocinas pró-inflamatórias como IL-8 e IL-1 β na mucosa (PLAZA-DÍAZ et al., 2017). Inflamações intestinais também sofrem com o acúmulo de radicais livres e o estresse oxidativo, as propriedades antioxidantes dos probióticos também exercem efeito anti-inflamatório através da inibição desses radicais.

Além de quadros inflamatórios, o consumo de probióticos é vital para o tratamento da disbiose, que ocorre com o desequilíbrio da flora bacteriana (WALKER, 2017). Evidências apontam que a perda de bactérias comensais e a proliferação de patógenos entéricos podem afetar a homeostase do intestino, desencadeando respostas inflamatórias e favorecendo o desenvolvimento de câncer colorretal, e o organismo como um todo, propiciando a alergia, asma e doenças metabólicas (CARDING et al., 2015). Usar bactérias benéficas como probióticos é vital para repovoar o intestino e restabelecer o equilíbrio perdido com a disbiose. O uso de simbióticos, a associação de prébióticos e probióticos, tem sido adotada pelos mecanismos já citados, a competição com patógenos, excreção de peptídeos bioativos, melhora na permeabilidade do epitélio intestinal e interação imunológica, (APPANNA, 2018).

Os mecanismos antimicrobianos dos probióticos tem sido investigado para uso na prevenção e tratamento de doenças infecciosas. A resistência antibiótica tem se consolidado como um dos principais problemas de saúde pública, responsável por cerca de 700.000 mortes ao redor do mundo, sendo as infecções diarreicas associadas a 1,5 milhões de óbitos no ano de 2019, tratamentos adjuvantes e alternativos são alvo de pesquisas (HUEMER et al., 2020; WHO, 2019). Essas bactérias são capazes de reduzir a incidência de infecções agudas do trato respiratório superior, prevenção e efeito adjuvante a antibióticos no combate a infecções urinárias pediátricas (ROSTAMI et al., 2018). O uso profilático de probióticos em modelos de sepse em animais também tem recebido atenção, com resultados como a melhora na taxa de mortalidade dos animais tratados, diminuição da bacteremia e redução de citocinas pró-inflamatórias (KHAILOVA et al., 2013).

Diversas pesquisas apontam para o uso de probiótico na profilaxia e tratamento de doenças. Entretanto, é importante ressaltar que quando veiculado como alimento funcional, não pode ser considerado tratamento, mas ferramenta de promoção a saúde.

4. REFERÊNCIAS

AFONSO, S. R. A CADEIA PRODUTIVA DO BURITI (*Mauritia* sp). **V CONFLAT**, 2011.

ALZOGHAIBI, M. A. Concepts of oxidative stress and antioxidant defense in Crohn's disease. **World Journal of Gastroenterology : WJG**, v. 19, n. 39, p. 6540, 21 out. 2013.

AMARIZ, A. **Qualidade, compostos bioativos e atividade antioxidante de frutos de acessos de jerimum de leite (*Cucurbita moschata*) pertencentes ao Banco Ativo de Germoplasma de Cucurbitáceas da Embrapa Semiárido**. Universidade Federal Rural do Semi-Árido, , 21 fev. 2011. Disponível em: <<https://repositorio.ufersa.edu.br/handle/tede/44>>. Acesso em: 25 jan. 2025

AMBRIZ-PÉREZ, D. L. et al. Phenolic compounds: Natural alternative in inflammation treatment. A Review. **Cogent Food & Agriculture**, v. 2, n. 1, 31 dez. 2016.

ANJANA; TIWARI, S. K. Bacteriocin-Producing Probiotic Lactic Acid Bacteria in Controlling Dysbiosis of the Gut Microbiota. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, v. 12, p. 851140, 16 maio 2022.

APPANNA, V. D. Dysbiosis, Probiotics, and Prebiotics: In Diseases and Health. **Human Microbes - The Power Within**, p. 81–122, 2018.

ARBOS, K. A.; STEVANI, P. C.; CASTANHA, R. DE F. Atividade antimicrobiana, antioxidante e teor de compostos fenólicos em casca e amêndoa de frutos de manga. **Revista Ceres**, v. 60, n. 2, p. 161–165, 2013.

ARROYO, L. G. et al. Luminal and Mucosal Microbiota of the Cecum and Large Colon of Healthy and Diarrheic Horses. **Animals : an open access journal from MDPI**, v. 10, n. 8, p. 1–12, 1 ago. 2020.

ASPRI, M.; PAPADEMAS, P.; TSALTAS, D. Review on Non-Dairy Probiotics and Their Use in Non-Dairy Based Products. **Fermentation 2020, Vol. 6, Page 30**, v. 6, n. 1, p. 30, 26 fev. 2020.

AYDAR, E. F.; TUTUNCU, S.; OZCELIK, B. Plant-based milk substitutes: Bioactive compounds, conventional and novel processes, bioavailability studies, and health effects. **Journal of Functional Foods**, v. 70, p. 103975, 1 jul. 2020.

BARBOZA, N. L. et al. Buriti (*Mauritia flexuosa* L. f.): An Amazonian fruit with potential health benefits. **Food Research International**, v. 159, p. 111654, 1 set. 2022.

BARROQUEIRO, E. S. B. et al. Immunomodulatory and antimicrobial activity of babassu mesocarp improves the survival in lethal sepsis. **Wiley Online LibraryESB Barroqueiro, DS Prado, PS Barcellos, TA Silva, WS Pereira, LA Silva, MCG MacielEvidence-Based Complementary and Alternative Medicine, 2016•Wiley Online Library**, v. 2016, 2016.

BATISTA CARNEIRO, T.; MELLO CARNEIRO, J. G. DE. Frutos e polpa desidratada buriti, *Mauritia flexuosa* L.: aspectos físicos, químicos e tecnológicos. **Revista Verde de Agroecologia e Desenvolvimento Sustentável**, ISSN-e 1981-8203, Vol. 6, Nº. 2, 2011, v. 6,

n. 2, p. 22, 2011.

BELLOCO, A. et al. Low environmental pH is responsible for the induction of nitric-oxide synthase in macrophages: Evidence for involvement of nuclear factor- κ B activation. **Journal of Biological Chemistry**, v. 273, n. 9, p. 5086–5092, 27 fev. 1998.

BENÍTEZ-CHAO, D. F. et al. Bacteriocins: An Overview of Antimicrobial, Toxicity, and Biosafety Assessment by in vivo Models. **Frontiers in Microbiology**, v. 12, p. 630695, 15 abr. 2021.

BENSAADA, H.; SOTO-GARCIA, M. F.; CARMONA-HERNANDEZ, J. C. Antioxidant Activity of Polyphenols, from *Mauritia flexuosa* (Aguaje), Based on Controlled Dehydration. **Molecules** 2022, Vol. 27, Page 3065, v. 27, n. 10, p. 3065, 10 maio 2022.

BERKÖZ, M. et al. Myricetin inhibits angiotensin converting enzyme and induces nitric oxide production in HUVEC cell line. **General physiology and biophysics**, v. 39, n. 3, p. 249–258, 2020.

BINDA, S. et al. Criteria to Qualify Microorganisms as “Probiotic” in Foods and Dietary Supplements. **Frontiers in Microbiology**, v. 11, p. 1662, 24 jul. 2020.

BOY, F. R. et al. Antioxidant, Antihypertensive and Antimicrobial Properties of Phenolic Compounds Obtained from Native Plants by Different Extraction Methods. **International journal of environmental research and public health**, v. 18, n. 5, p. 1–12, 1 mar. 2021.

BUSTOS, A. Y. et al. Recent Advances in the Understanding of Stress Resistance Mechanisms in Probiotics: Relevance for the Design of Functional Food Systems. **Probiotics and Antimicrobial Proteins** 2024, p. 1–21, 3 jun. 2024.

CARDING, S. et al. Dysbiosis of the gut microbiota in disease. **Microbial Ecology in Health & Disease**, v. 26, n. 0, 2 fev. 2015.

CARNEIRO, B. L. A. et al. Estudo da estabilidade do extrato hidrossolúvel “leite” de babaçu (*Orbygnia speciosa*) pasteurizado e armazenado sob refrigeração. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 36, n. 1, p. 232–236, 1 jan. 2014.

CELIBERTO, L. S. et al. Effect of a probiotic beverage consumption (*Enterococcus faecium* CRL 183 and *Bifidobacterium longum* ATCC 15707) in rats with chemically induced colitis. **PLOS ONE**, v. 12, n. 4, p. e0175935, 1 abr. 2017.

CERQUEIRA, N. F.; YOSHIDA, W. B. Óxido nítrico: revisão. **Acta Cirúrgica Brasileira**, v. 17, n. 6, p. 417–423, 2002.

CHUA, J. C. L. et al. Bacterial survival and adhesion for formulating new oral probiotic foods. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 60, n. 17, p. 2926–2937, 24 set. 2020.

COATES, M. et al. The Skin and Intestinal Microbiota and Their Specific Innate Immune Systems. **Frontiers in immunology**, v. 10, 17 dez. 2019.

COSTA, F. F. et al. **Antioxidant and Antimicrobial Properties of Probiotics: Insights from In Vitro Assays. Probiotics and Antimicrobial Proteins** Springer, , 2024.

CRUZ REINA, L. J. et al. Chemical composition and bioactive compounds of cashew (*Anacardium occidentale*) apple juice and bagasse from Colombian varieties. **Heliyon**, v. 8, n. 5, p. e09528, 1 maio 2022.

CSATLOS, N. et al. Development of a Fermented Beverage with *Chlorella vulgaris* Powder on Soybean-Based Fermented Beverage. **mdpi.com** NI Csatos, E Simon, BE Teleky, K Szabo, ZM Diaconeasa, DC Vodnar, C Ciont, OL Pop **Biomolecules**, 2023•**mdpi.com**, 2023.

CUI, H. H. et al. Effects of probiotic on intestinal mucosa of patients with ulcerative colitis. **World journal of gastroenterology**, v. 10, n. 10, p. 1521–1525, 15 maio 2004.

CURIMBABA, T. F. S. et al. Prebiotic, antioxidant and anti-inflammatory properties of edible Amazon fruits. **Food Bioscience**, v. 36, p. 100599, 1 ago. 2020.

CYR, A. R. et al. Nitric Oxide and Endothelial Dysfunction. **Critical care clinics**, v. 36, n. 2, p. 307, 1 abr. 2020.

DA SILVA, L. A. et al. Cupuassu juice fermentation by *Lactiplantibacillus plantarum* Lp62 produces an antioxidant enriched probiotic beverage. **Letters in Applied Microbiology**, v. 76, n. 3, p. 1–8, 1 mar. 2023.

DAVANI-DAVARI, D. et al. Prebiotics: Definition, Types, Sources, Mechanisms, and Clinical Applications. **Foods 2019, Vol. 8, Page 92**, v. 8, n. 3, p. 92, 9 mar. 2019.

DE ASSIS, B. B. et al. Biotransformation of the Brazilian Caatinga fruit-derived phenolics by *Lactobacillus acidophilus* La-5 and *Lacticaseibacillus casei* 01 impacts bioaccessibility. **Food Research International**, , 2021a.

DE ASSIS, B. B. T. et al. Biotransformation of the Brazilian Caatinga fruit-derived phenolics by *Lactobacillus acidophilus* La-5 and *Lacticaseibacillus casei* 01 impacts bioaccessibility and antioxidant activity. **Food Research International**, v. 146, p. 110435, 1 ago. 2021b.

DE CARVALHO MARCHESIN, J. et al. A soy-based probiotic drink modulates the microbiota and reduces body weight gain in diet-induced obese mice. **Journal of Functional Foods**, v. 48, p. 302–313, 1 set. 2018.

DENDENA, B.; CORSI, S. Cashew, from seed to market: A review. **Agronomy for Sustainable Development**, v. 34, n. 4, p. 753–772, 24 set. 2014.

DIAS-SOUZA, M. V. et al. Antibiofilm activity of cashew juice pulp against *Staphylococcus aureus*, high performance liquid chromatography/diode array detection and gas chromatography-mass spectrometry analyses, and interference on antimicrobial drugs. **Journal of Food and Drug Analysis**, v. 25, n. 3, p. 589–596, 1 jul. 2017.

DIETL, K. et al. Lactic Acid and Acidification Inhibit TNF Secretion and Glycolysis of Human Monocytes. **The Journal of Immunology**, v. 184, n. 3, p. 1200–1209, 1 fev. 2010.

DINI, C.; BOLLA, P. A.; DE URRAZA, P. J. Treatment of in vitro enterohemorrhagic *Escherichia coli* infection using phage and probiotics. **Journal of applied microbiology**, v. 121, n. 1, p. 78–88, 1 jul. 2016.

DO AMARAL E PAIVA, M. J. et al. Probiotic plant-based beverage with coconut, mango, and yam as a carrier of *Lactiplantibacillus plantarum*, *Lactocaseibacillus rhamnosus* GG, and *Lactobacillus acidophilus*: impact on viability and quality. **Journal of Food Science and Technology**, p. 1–12, 27 nov. 2024.

DOUGLASS, M. S. et al. L-citrulline increases arginase II protein levels and arginase activity in hypoxic piglet pulmonary artery endothelial cells. **Pulmonary Circulation**, v. 11, n. 2, p. 20458940211006290, 2021.

DUTRA, R. P. et al. Phenolic acids, hydrolyzable tannins, and antioxidant activity of geopropolis from the stingless bee *melipona fasciculata* smith. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 62, n. 12, p. 2549–2557, 26 mar. 2014.

DUTRA, R. P. et al. Brazilian Amazon Red Propolis: Leishmanicidal Activity and Chemical Composition of a New Variety of Red Propolis. **Metabolites** **2023**, Vol. 13, Page 1027, v. 13, n. 9, p. 1027, 21 set. 2023.

EL-DEIN, A. et al. Assessment of exopolysaccharides, bacteriocins and in vitro and in vivo hypocholesterolemic potential of some Egyptian *Lactobacillus* spp. **International Journal of Biological Macromolecules**, 2021.

ERRA DÍAZ, F.; DANTAS, E.; GEFFNER, J. Unravelling the Interplay between Extracellular Acidosis and Immune Cells. **Mediators of Inflammation**, v. 2018, n. 1, p. 1218297, 1 jan. 2018.

ESPERANÇA, V. J. D. R. et al. A review on plant-based tree nuts beverages: technological, sensory, nutritional, health and microbiological aspects. **Taylor & FrancisV Jonas da Rocha Esperança, C Corrêa de Souza Coelho, R Tonon, R TorrezanInternational Journal of Food Properties**, **2022**•Taylor & Francis, v. 25, n. 1, p. 2396–2408, 2022.

FENSTER, K. et al. The Production and Delivery of Probiotics: A Review of a Practical Approach. **Microorganisms** **2019**, Vol. 7, Page 83, v. 7, n. 3, p. 83, 17 mar. 2019.

FLINT, H. J.; DUNCAN, S. H.; LOUIS, P. The impact of nutrition on intestinal bacterial communities. **Current opinion in microbiology**, v. 38, p. 59–65, 1 ago. 2017.

FUJIWARA, S. et al. Proteinaceous factor(s) in culture supernatant fluids of bifidobacteria which prevents the binding of enterotoxigenic *Escherichia coli* to gangliotetraosylceramide. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 63, n. 2, p. 506, 1997.

FURMAN, D. et al. Chronic inflammation in the etiology of disease across the life span. **Nature Medicine** **2019** **25**:12, v. 25, n. 12, p. 1822–1832, 5 dez. 2019.

GASBARRINI, G.; BONVICINI, F.; GRAMENZI, A. Probiotics History. **Journal of Clinical Gastroenterology**, v. 50, p. S116–S119, 1 dez. 2016.

GIRI, S. S. et al. Protective effects of leucine against lipopolysaccharide-induced inflammatory response in *Labeo rohita* fingerlings. **Fish & Shellfish Immunology**, v. 52, p. 239–247, 1 maio 2016.

GROSSMANN, L. et al. Standardized methods for testing the quality attributes of plant-based foods: Milk and cream alternatives. **Comprehensive reviews in food science and food safety**, v. 20, n. 2, p. 2206–2233, 1 mar. 2021.

GROUSSIN, M.; MAZEL, F.; ALM, E. J. Co-evolution and Co-speciation of Host-Gut Bacteria Systems. **Cell Host and Microbe**, v. 28, n. 1, p. 12–22, 8 jul. 2020.

GUAN, Q.; XIONG, T.; XIE, M. Influence of Probiotic Fermented Fruit and Vegetables on Human Health and the Related Industrial Development Trend. **Engineering**, v. 7, n. 2, p. 212–218, 1 fev. 2021.

HAMAD, G. et al. Detection and inhibition of *Clostridium botulinum* in some Egyptian fish products by probiotics cell-free supernatants as bio-preservation agents. **ElsevierG Hamad, RA Ombarak, M Eskander, T Mehany, FR Anees, RA Elfayoumy, SA OmarLwt, 2022•Elsevier**, 2022.

HATI, S. et al. Short-chain fatty acid and vitamin production potentials of *Lactobacillus* isolated from fermented foods of Khasi Tribes, Meghalaya, India. **Annals of Microbiology**, v. 69, n. 11, p. 1191–1199, 1 nov. 2019.

HE, J. T. et al. An insight into the health beneficial of probiotics dairy products: a critical review. **Critical reviews in food science and nutrition**, v. 63, n. 32, p. 11290–11309, 2023.

HERNÁNDEZ-GRANADOS, M. J.; FRANCO-ROBLES, E. Postbiotics in human health: Possible new functional ingredients? **Food research international (Ottawa, Ont.)**, v. 137, 1 nov. 2020.

HILL, C. et al. 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 Gastroenterology and Hepatology**, v. 11, n. 8, p. 506–514, 2014a.

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** 2014 11:8, v. 11, n. 8, p. 506–514, 10 jun. 2014b.

HOLANDA, A. C. et al. Bioaccessibilidade dos polifenóis presentes no mesocarpo e na amêndoa do babaçu (*Orbignya phalerata* Mart.). **Brazilian Journal of Development**, v. 6, n. 4, p. 19237–19247, 2020.

HOLKEM, A. T.; SILVA, M. P. DA; FAVARO-TRINDADE, C. S. Probiotics and plant extracts: a promising synergy and delivery systems. **Critical reviews in food science and nutrition**, v. 63, n. 28, p. 9561–9579, 2023.

HUANG, R. et al. *Lactobacillus* and intestinal diseases: Mechanisms of action and clinical

applications. Elsevier **R Huang, F Wu, Q Zhou, W Wei, J Yue, B Xiao, Z Luo** *Microbiological research*, 2022 • Elsevier, 2022.

HUEMER, M. et al. Antibiotic resistance and persistence—Implications for human health and treatment perspectives. **EMBO reports**, v. 21, n. 12, 3 dez. 2020.

JENA, R.; CHOUDHURY, P. K. Bifidobacteria in Fermented Dairy Foods: A Health Beneficial Outlook. **Probiotics and Antimicrobial Proteins** 2023, v. 1, p. 1–22, 18 nov. 2023.

JEONG, C. H. et al. Enhancement of the functional properties of vegetable sponge beverage fermented with *Lactobacillus plantarum* isolated from Korean dongchimi. **LWT**, v. 165, p. 113721, 1 ago. 2022a.

JEONG, C. H. et al. Enhancement of the functional properties of vegetable sponge beverage fermented with *Lactobacillus plantarum* isolated from Korean dongchimi. **LWT**, v. 165, p. 113721, 1 ago. 2022b.

KANG, C. H. et al. Heat-Killed Lactic Acid Bacteria Inhibit Nitric Oxide Production via Inducible Nitric Oxide Synthase and Cyclooxygenase-2 in RAW 264.7 Cells. **Probiotics and Antimicrobial Proteins**, v. 13, n. 6, p. 1530, 1 dez. 2021.

KATOCH, G. K. et al. Lactose Intolerance and Its Dietary Management: An Update. **Journal of the American Nutrition Association**, v. 41, n. 4, p. 424–434, 2022.

KAUR, S.; DAS, M. Functional foods: An overview. **Food Science and Biotechnology**, v. 20, n. 4, p. 861–875, 31 ago. 2011.

KELLUM, J. A.; SONG, M.; LI, J. Lactic and hydrochloric acids induce different patterns of inflammatory response in LPS-stimulated RAW 264.7 cells. **American Journal of Physiology - Regulatory Integrative and Comparative Physiology**, v. 286, n. 4 55-4, p. 686–692, 2004.

KEMPKA, A. P. et al. Formulation of a peach-flavored dairy drink using alternative substrates and probiotic culture. **Ciencia e Tecnologia de Alimentos**, v. 28, n. SUPPL., p. 170–177, 2008.

KHAILOVA, L. et al. Probiotic Administration Reduces Mortality and Improves Intestinal Epithelial Homeostasis in Experimental Sepsis. **Anesthesiology**, v. 119, n. 1, p. 166, jul. 2013.

KIM, D.; OH, I. Development of fermented beverage with citrus fruit extract using probiotics: impact on antioxidant activity and in vitro digestibility. **Applied Biological Chemistry**, v. 67, n. 1, p. 1–11, 1 dez. 2024.

KLYUKIN, K.; ALEXANDROV, V. Kinetics of pH-dependent interactions between PD-1 and PD-L1 immune checkpoint proteins from molecular dynamics. **Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics**, v. 88, n. 9, p. 1162–1168, 1 set. 2020.

LATIF, A. et al. Probiotics: mechanism of action, health benefits and their application in food

industries. **Frontiers in Microbiology**, v. 14, p. 1216674, 2023a.

LATIF, A. et al. Probiotics: mechanism of action, health benefits and their application in food industries. **Frontiers in Microbiology**, v. 14, p. 1216674, 2023b.

LE, B.; ANH, P. T. N.; YANG, S. H. Enhancement of the Anti-Inflammatory Effect of Mustard Kimchi on RAW 264.7 Macrophages by the *Lactobacillus plantarum* Fermentation-Mediated Generation of Phenolic Compound Derivatives. **Foods** **2020**, Vol. **9**, Page **181**, v. 9, n. 2, p. 181, 12 fev. 2020.

LEE, M. et al. Immunobiology of Nitric Oxide and Regulation of Inducible Nitric Oxide Synthase. **Results and Problems in Cell Differentiation**, v. 62, p. 181–207, 2017.

LEONARD, W. et al. Fermentation transforms the phenolic profiles and bioactivities of plant-based foods. **Biotechnology Advances**, v. 49, p. 107763, 1 jul. 2021.

LIMA, J. A. L. DE et al. *Attalea speciosa* Mart. ex Spreng (Arecaceae): Uma revisão integrativa quanto as principais características biotecnológicas / *Attalea speciosa* Mart. ex Spreng (Arecaceae): An integrative review of the main biotechnological characteristics. **Brazilian Journal of Development**, v. 6, n. 7, p. 48639–48661, 20 jul. 2020.

LIMA, M. M. A. et al. Photoprotective and antioxidant effect of babassu mesocarp flour extracts. **Acta Amazonica**, v. 53, n. 4, p. 294–301, 13 nov. 2023.

LIU, Y. et al. Beneficial Effects of Tomato Juice Fermented by *Lactobacillus Plantarum* and *Lactobacillus Casei*: Antioxidation, Antimicrobial Effect, and Volatile Profiles. **Molecules : A Journal of Synthetic Chemistry and Natural Product Chemistry**, v. 23, n. 9, p. 2366, 16 set. 2018.

LOPES, R. DE C. S. O. et al. Modulation of intestinal microbiota, control of nitrogen products and inflammation by pre/probiotics in chronic kidney disease: a systematic review. **Nutricion hospitalaria**, 2018.

LOURYVAL COELHO PAIXÃO et al. APLICAÇÕES FARMACÊUTICAS E BIOPRODUTOS DO BABAÇU (*Attalea speciosa* Mart.ex Spreng): REVISÃO. **Revista de Ciências da Saúde**, v. 21, n. 2, 2019.

MAN, M. Q. et al. Regulatory Role of Nitric Oxide in Cutaneous Inflammation. **Inflammation** **2021** **45:3**, v. 45, n. 3, p. 949–964, 30 jan. 2022.

MAO, Y.; ZHANG, X.; XU, Z. Identification of antibacterial substances of *Lactobacillus plantarum* DY-6 for bacteriostatic action. **Food science & nutrition**, v. 8, n. 6, p. 2854–2863, 1 jun. 2020.

MARCO, M. L. et al. Health benefits of fermented foods: microbiota and beyond. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 44, p. 94–102, 1 abr. 2017.

MARTA, S.; SAAD, I.; SAAD, S. M. I. Probióticos e prebióticos: o estado da arte. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 42, n. 1, p. 1–16, mar. 2006.

- MATHIEU, S.; DORARD, G. Végétarisme, végétalisme, véganisme : aspects motivationnels et psychologiques associés à l'alimentation sélective. **La Presse Médicale**, v. 45, n. 9, p. 726–733, 1 set. 2016.
- MAYR, F. B.; YENDE, S.; ANGUS, D. C. Epidemiology of severe sepsis. **Virulence**, v. 5, n. 1, p. 4, 2013.
- MILANEZ, J. T. et al. Bioactive compounds and antioxidant activity of buriti fruits, during the postharvest, harvested at different ripening stages. **Scientia Horticulturae**, v. 227, p. 10–21, 3 jan. 2018.
- MOJIKON, F. D. et al. Probiotication of Nutritious Fruit and Vegetable Juices: An Alternative to Dairy-Based Probiotic Functional Products. **Nutrients**, v. 14, n. 17, 1 set. 2022.
- MONTEAGUDO-MERA, A. et al. Adhesion mechanisms mediated by probiotics and prebiotics and their potential impact on human health. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 103, n. 16, p. 6463–6472, 16 ago. 2019.
- MONTEMURRO, M. et al. Plant-Based Alternatives to Yogurt: State-of-the-Art and Perspectives of New Biotechnological Challenges. **Foods (Basel, Switzerland)**, v. 10, n. 2, 1 fev. 2021.
- NAGAO-KITAMOTO, H. et al. Pathogenic role of the gut microbiota in gastrointestinal diseases. **Intestinal Research**, v. 14, n. 2, p. 127–138, 2016.
- NEUHANNIG, C. et al. Intestinal dysbiosis: Correlation with current chronic diseases and nutritional intervention. **Research, Society and Development**, v. 8, n. 6, p. e25861054–e25861054, 29 mar. 2019.
- NOH, H. J. et al. Immunostimulatory Effect of Heat-Killed Probiotics on RAW264.7 Macrophages. **Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 32, n. 5, p. 638, 1 maio 2022.
- NUALKAEKUL, S.; CHARALAMPOPOULOS, D. Survival of *Lactobacillus plantarum* in model solutions and fruit juices. **International Journal of Food Microbiology**, v. 146, n. 2, p. 111–117, 30 mar. 2011.
- OJHA, A. K.; SHAH, N. P.; MISHRA, V. Conjugal Transfer of Antibiotic Resistances in *Lactobacillus* spp. **Current microbiology**, v. 78, n. 8, p. 2839–2849, 1 ago. 2021.
- OLIVEIRA, N. N. et al. Cashew nut and cashew apple: a scientific and technological monitoring worldwide review. **Journal of Food Science and Technology**, v. 57, n. 1, p. 12–21, 1 jan. 2020.
- OLIVEIRA-JÚNIOR, J. B. et al. In vitro activity of riparin III in combination with antimicrobials against multidrug-resistant clinical isolates of *Staphylococcus aureus* and *Acinetobacter baumannii*. **Phytomedicine Plus**, v. 3, n. 1, p. 100414, 1 fev. 2023.
- OZEN, M.; DINLEYICI, E. C. **The history of probiotics: The untold story. Beneficial Microbes** Wageningen Academic Publishers, , 2015.

PANGHAL, A. et al. Potential non-dairy probiotic products – A healthy approach. **Food Bioscience**, v. 21, p. 80–89, 1 fev. 2018.

PAPADIMITRIOU, K. et al. Discovering probiotic microorganisms: In vitro, in vivo, genetic and omics approaches. **Frontiers in Microbiology**, v. 6, n. FEB, p. 129543, 17 fev. 2015.

PASSARIELLO, A.; AGRICOLE, P.; MALFERTHEINER, P. A critical appraisal of probiotics (as drugs or food supplements) in gastrointestinal diseases. **Current Medical Research and Opinion**, v. 30, n. 6, p. 1055–1064, 2014.

PEREIRA, A. L. F. et al. Storage Stability and Acceptance of Probiotic Beverage from Cashew Apple Juice. **Food and Bioprocess Technology**, v. 6, n. 11, p. 3155–3165, 1 nov. 2013.

PEREIRA, A. L. F. et al. Impact of fermentation conditions on the quality and sensory properties of a probiotic cupuassu (*Theobroma grandiflorum*) beverage. **Food Research International**, v. 100, p. 603–611, 1 out. 2017.

PEREIRA, A. L. F.; MACIEL, T. C.; RODRIGUES, S. Probiotic beverage from cashew apple juice fermented with *Lactobacillus casei*. **Food Research International**, v. 44, n. 5, p. 1276–1283, 1 jun. 2011.

PLAZA-DÍAZ, J. et al. Evidence of the Anti-Inflammatory Effects of Probiotics and Synbiotics in Intestinal Chronic Diseases. **Nutrients** **2017**, Vol. 9, Page 555, v. 9, n. 6, p. 555, 28 maio 2017.

PLAZA-DÍAZ, J. et al. The Gut Barrier, Intestinal Microbiota, and Liver Disease: Molecular Mechanisms and Strategies to Manage. **International Journal of Molecular Sciences** **2020**, Vol. 21, Page 8351, v. 21, n. 21, p. 8351, 7 nov. 2020.

PRAMANIK, S.; VENKATRAMAN, S.; VAIDYANATHAN, V. K. Development of engineered probiotics with tailored functional properties and their application in food science. **Food science and biotechnology**, v. 32, n. 4, p. 453–470, 1 mar. 2023.

RASIKA, D. M. et al. Plant-based milk substitutes as emerging probiotic carriers. **Current Opinion in Food Science**, v. 38, p. 8–20, 1 abr. 2021.

REID, G.; GADIR, A. A.; DHIR, R. Probiotics: Reiterating What They Are and What They Are Not. **Frontiers in Microbiology**, v. 10, n. MAR, p. 424, 2019.

RITCHIE, M. L.; ROMANUK, T. N. A meta-analysis of probiotic efficacy for gastrointestinal diseases. **PloS one**, v. 7, n. 4, 18 abr. 2012.

ROCCHETTI, G. et al. Functional implications of bound phenolic compounds and phenolics–food interaction: A review. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, v. 21, n. 2, p. 811–842, 1 mar. 2022.

ROLHION, N.; CHASSAING, B. When pathogenic bacteria meet the intestinal microbiota. **Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences**, v. 371, n. 1707, 1 nov. 2016.

ROSTAMI, F. M. et al. Efficacy of Probiotics in Prevention and Treatment of Infectious Diseases. **Clinical Microbiology Newsletter**, v. 40, n. 12, p. 97–103, 15 jun. 2018.

RU, Y. R. et al. The influence of probiotic fermentation on the active compounds and bioactivities of walnut flowers. **Journal of food biochemistry**, v. 46, n. 4, 1 abr. 2022.

SALMINEN, S. Uniqueness of probiotic strains. **IDF Nutrition Newsletter**, v. 4, n. 145, p. 18–19, 15 nov. 1996.

SALMINEN, S. et al. The International Scientific Association of Probiotics and Prebiotics (ISAPP) consensus statement on the definition and scope of postbiotics. **Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology** 2021 18:9, v. 18, n. 9, p. 649–667, 4 maio 2021.

SANTIAGO, H. et al. Composição de Alimentos e Exigências Nutricionais 3 a Edição Editor: Horacio Santiago Rostagno. 2011.

SASI, M. et al. Current trends in the development of soy-based foods containing probiotics and paving the path for soy-synbiotics. **Critical reviews in food science and nutrition**, v. 63, n. 29, p. 9995–10013, 2023.

SCOTT, K. P. et al. Dietary prebiotics: current status and new definition. **Food Science and Technology Bulletin: Functional Foods**, v. 7, n. 1, p. 1–19, 2010.

SILVA, N. F. DA et al. Estudo etnofarmacológico e propriedade antifúngica de duas espécies medicinais: *Anacardium occidentale* (Linn) (Cajueiro, Anacardiaceae) e *Schinus terebinthifolius* Raddi (Aroeira, Anacardiaceae) / Ethnopharmacological study and antifungal properties of two edicinal species: *Anacardium occidentale* (Linn) (Cajueiro, Anacardiaceae) and *Schinus terebinthifolius* Raddi (Aroeira, Anacardiaceae). **Brazilian Journal of Development**, v. 7, n. 1, p. 9791–9806, 25 jan. 2021.

SINGH, B. et al. Antioxidative, ACE inhibitory and antibacterial activities of soy milk fermented by indigenous strains of lactobacilli. **Wiley Online LibraryBP Singh, B Bhushan, S VijLegume Science, 2020•Wiley Online Library**, v. 2, n. 4, 1 dez. 2020.

SINGH, S. S. et al. Physical, chemical, textural, and thermal properties of cashew apple fruit. **Journal of Food Process Engineering**, v. 42, n. 5, p. e13094, 1 ago. 2019.

SOKAL, R. et al. Biostatistics. **academia.edu**, 1987.

SOLTANI, S. et al. Bacteriocins as a new generation of antimicrobials: toxicity aspects and regulations. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 45, n. 1, 8 jan. 2021.

STATISTA. **Europe: plant-based meals sales 2022** | Statista. Disponível em: <<https://www.statista.com/statistics/1404907/plant-based-meals-market-size-in-europe/>>. Acesso em: 11 jan. 2025.

STATISTA. **Chart: How Popular Are Meat-Free Diets?** | Statista. Disponível em: <<https://www.statista.com/chart/33160/respondents-who-follow-a-vegetarian-vegan-diet/>>. Acesso em: 11 jan. 2025a.

STATISTA. **Consumption of vegetarian diet in selected countries worldwide 2024 | Statista**. Disponível em: <<https://www.statista.com/forecasts/1452526/share-of-consumers-following-a-vegetarian-diet-in-selected-countries-worldwide>>. Acesso em: 11 jan. 2025b.

SU, Y. et al. Screening and Molecular Mechanisms of Novel ACE-Inhibitory Peptides from *Gracilariopsis lemaneiformis*. **mdpi.com** Y Su, S Chen, J Shen, Z Yi, S Liu, S Cai, N Pan, K Qiao, X Chen, B Chen, M Xu, S Yang **International Journal of Molecular Sciences**, 2022•**mdpi.com**, [s.d.].

SUBHASHREE, S.; KAVITA, M. S. A study on suitable non dairy food matrix for probiotic bacteria - A systematic review. **Current Research in Nutrition and Food Science**, v. 7, n. 1, p. 5–16, 1 abr. 2019.

TAKEUCHI, T.; OHNO, H. IgA in human health and diseases: Potential regulator of commensal microbiota. **Frontiers in Immunology**, v. 13, p. 1024330, 10 nov. 2022.

TANG, Z. et al. Evaluation of fermentation properties, antioxidant capacity in vitro and in vivo, and metabolic profile of a fermented beverage made from apple and cantaloupe. **LWT-Food Science and Technology**, v. 179, p. 114661, 2023.

TANNOCK, G. W. et al. Analysis of the fecal microflora of human subjects consuming a probiotic product containing *Lactobacillus rhamnosus* DR20. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 66, n. 6, p. 2578–2588, jun. 2000.

TEIXEIRA, P. R. S. et al. Chemically modified babassu coconut (*Orbignya* sp.) biopolymer: characterization and development of a thin film for its application in electrochemical sensors. **Journal of Polymer Research**, v. 25, n. 5, p. 1–11, 1 maio 2018.

TEREFE, N. S. Emerging Trends and Opportunities in Food Fermentation. **Reference Module in Food Science**, 1 jan. 2016.

THODA, C.; TOURAKI, M. Immunomodulatory Properties of Probiotics and Their Derived Bioactive Compounds. **Applied Sciences** 2023, Vol. 13, Page 4726, v. 13, n. 8, p. 4726, 9 abr. 2023a.

THODA, C.; TOURAKI, M. Immunomodulatory Properties of Probiotics and Their Derived Bioactive Compounds. **Applied Sciences** 2023, Vol. 13, Page 4726, v. 13, n. 8, p. 4726, 9 abr. 2023b.

ULLMAN, T.; GASTROENTEROLOGY, S. I.-; 2011, UNDEFINED. Intestinal inflammation and cancer. **Elsevier**, [s.d.].

UPADHYAY, R. et al. Antioxidant Property of Aerial Parts and Root of *Phyllanthus fraternus* Webster, an Important Medicinal Plant. **The Scientific World Journal**, v. 2014, n. 1, p. 692392, 1 jan. 2014.

VALERO-CASES, E.; NUNCIO-JÁUREGUI, N.; FRUTOS, M. J. Influence of Fermentation with Different Lactic Acid Bacteria and in Vitro Digestion on the Biotransformation of Phenolic Compounds in Fermented Pomegranate Juices. **Journal of Agricultural and Food**

Chemistry, v. 65, n. 31, p. 6488–6496, 9 ago. 2017.

VAN ZYL, W. F.; DEANE, S. M.; DICKS, L. M. T. Molecular insights into probiotic mechanisms of action employed against intestinal pathogenic bacteria. **Gut Microbes**, v. 12, n. 1, p. 1831339, 9 nov. 2020.

VIAȘU-BOLOCAN, L.; POPESCU, F.; BICĂ, C. **Liana Viașu-Bolocan et al.-Probiotics and their Immunomodulatorz Potential Review Probiotics and their Immunomodulatory Potential**. [s.l: s.n.].

WALKER, W. A. Dysbiosis. **The Microbiota in Gastrointestinal Pathophysiology: Implications for Human Health, Prebiotics, Probiotics, and Dysbiosis**, p. 227–232, 1 jan. 2017.

WANG, H. et al. Lipid peroxidation-induced ferroptosis as a therapeutic target for mitigating neuronal injury and inflammation in sepsis-associated encephalopathy: insights into the hippocampal PEBP-1/15-LOX/GPX4 pathway. **Lipids in Health and Disease**, v. 23, n. 1, p. 1–13, 1 dez. 2024.

WANG, P. et al. Kombucha ameliorates LPS-induced sepsis in a mouse model. **Food & Function**, v. 12, n. 20, p. 10263–10280, 19 out. 2021.

WANG, X. et al. Probiotics regulate gut microbiota: an effective method to improve immunity. **mdpi.com**X Wang, P Zhang, X Zhang**Molecules**, 2021•**mdpi.com**, [s.d.].

WANG, Z. et al. From Function to Metabolome: Metabolomic Analysis Reveals the Effect of Probiotic Fermentation on the Chemical Compositions and Biological Activities of *Perilla frutescens* Leaves. **Frontiers in Nutrition**, v. 9, 11 jul. 2022.

WESTERMANN, C. et al. A Critical Evaluation of Bifidobacterial Adhesion to the Host Tissue. **Frontiers in Microbiology**, v. 7, n. AUG, p. 1220, 5 ago. 2016.

WIEËRS, G. et al. How Probiotics Affect the Microbiota. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, v. 9, p. 490925, 15 jan. 2020.

WITTOUCK, S. et al. A Genome-Based Species Taxonomy of the *Lactobacillus* Genus Complex . **mSystems**, v. 4, n. 5, 29 out. 2019.

WONG, V. C.; LERNER, E. Nitric oxide inhibition strategies. **Future Science OA**, v. 1, n. 1, p. FSO35, 1 ago. 2015.

WOO, J.; AHN, J. Probiotic-mediated competition, exclusion and displacement in biofilm formation by food-borne pathogens. **Letters in Applied Microbiology**, v. 56, n. 4, p. 307–313, 1 abr. 2013.

WU, Y. et al. Fermentation of blueberry and blackberry juices using *Lactobacillus plantarum*, *Streptococcus thermophilus* and *Bifidobacterium bifidum*: Growth of probiotics. **Elsevier**Y Wu, S Li, Y Tao, D Li, Y Han, PL Show, G Wen, J Zhou**Food Chemistry**, 2021•**Elsevier**, 2023.

XIE, M. et al. Two separate mechanisms are involved in membrane permeabilization during lipid oxidation. **Biophysical journal**, v. 122, n. 23, p. 4503–4517, 5 dez. 2023.

ZAWISTOWSKA-ROJEK, A.; TYSKI, S. Are Probiotic Really Safe for Humans? **Polish Journal of Microbiology**, v. 67, n. 3, p. 251, 2018.

ZENDEBOODI, F. et al. Probiotic: conceptualization from a new approach. **Current Opinion in Food Science**, v. 32, p. 103–123, 1 abr. 2020.

ZHANG, Z. et al. Roles and applications of probiotic Lactobacillus strains. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 102, n. 19, p. 8135–8143, 1 out. 2018.

ZHAO, Z. et al. Evaluation of a strawberry fermented beverage with potential health benefits. **PeerJ**, v. 9, p. e11974, 23 ago. 2021.

ZHENG, J. et al. A taxonomic note on the genus Lactobacillus: Description of 23 novel genera, emended description of the genus Lactobacillus beijerinck 1901, and union of Lactobacillaceae and Leuconostocaceae. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 70, n. 4, p. 2782–2858, 15 abr. 2020.

ZHONG, H. et al. Probiotics-fermented blueberry juices as potential antidiabetic product: antioxidant, antimicrobial and antidiabetic potentials. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 101, n. 10, p. 4420–4427, 15 ago. 2021.

ZMORA, N. et al. Inflammasomes and intestinal inflammation. [s.d.].

ZOMMITI, M.; FEUILLOLEY, M. G. J.; CONNIL, N. Update of Probiotics in Human World: A Nonstop Source of Benefactions till the End of Time. **Microorganisms 2020, Vol. 8, Page 1907**, v. 8, n. 12, p. 1907, 30 nov. 2020.

5. CAPÍTULO I (ANEXO I)

ANTIOXIDANT AND ANTIMICROBIAL PROPERTIES OF PROBIOTICS: INSIGHTS FROM IN VITRO ASSAYS

Revista: Probiotics and Antimicrobial Proteins (ISSN: 1867-1306)

Qualis/Fator de Impacto: A3/4.4

Data da publicação: 24 de dezembro de 2024

Fernanda Farias Costa, Tatielle Gomes Dias, Priscila Mendonça Mendes, Jesse Pereira Machado Viana, Eveline Brandão Madeira, Ana Lúcia Fernandes Pereira, Adriana Gomes Nogueira Ferreira, Marcelino Santos Neto, Richard Pereira Dutra, Aramys Silva Reis, Márcia Cristina Gonçalves Maciel

Abstract

Probiotics are microorganisms that provide health benefits at adequate doses and exhibit notable antioxidant and antimicrobial activities. These properties play crucial roles in combating chronic diseases linked to oxidative stress and antimicrobial resistance. This review aimed to summarize the antioxidant and antimicrobial properties of probiotics determined in in vitro studies and discuss mechanistic actions and analysis methods. The MEDLINE (PubMed), Web of Science, Scopus, Science Direct, and Embase databases were utilized. The included articles demonstrated the antioxidant and antimicrobial activities of both isolated and food matrix-associated probiotics, with the most common genera being *Lactobacillus*, *Bifidobacterium*, *Saccharomyces*, and *Streptococcus*. Antioxidant activity was the most studied property, yielding varied results attributed to evaluation tests and probiotic strain. Antibacterial activity was consistently reported in all studies. Additionally, fermentation with probiotic microorganisms improved the content and bioaccessibility of bioactive compounds. In conclusion, analysis results highlight the antioxidant and antimicrobial activity of probiotics reported in in vitro studies. They enhance bioactive content and bioaccessibility and produce novel beneficial metabolites during fermentation. These results reinforce the therapeutic promise of probiotics associated with plant matrices and indicate the need for clinical studies to confirm their efficacy in improving human health.

Keywords: Nutraceuticals; Bioactives; Biotransformation; Bacteriocins; Fermented Foods.

7. CAPÍTULO II

BEBIDAS PROBIÓTICAS MISTAS COM BABAÇU: ATIVIDADE IMUNOMODULADORA, ANTIOXIDANTE E ANTIBACTERIANA DA COMBINAÇÃO COM BURITI OU CAJU

INTRODUÇÃO

Probióticos são microrganismos vivos potencialmente benéficos para a saúde humana, desde que administrados em quantidades adequadas (HILL et al., 2014a). Possuem capacidade de regular a microbiota intestinal, combater a disbiose, além de atividade antioxidante, imunomoduladora e antimicrobiana (PLAZA-DÍAZ et al., 2020). Por exemplo, bactérias produtoras de ácido láctico, como o gênero *Lactobacillus*, demonstraram ser capazes de inibir a peroxidação do ácido linoleico e a autooxidação do ascorbato, também produzem peptídeos bioativos como bacteriocinas, capazes de inibir bactérias patogênicas por diversas vias, além de estimularem o sistema imunológico interagindo com o epitélio e células do sistema imune (ANJANA; TIWARI, 2022).

Esses produtos são tradicionalmente associados a bebidas lácteas; no entanto, a incorporação de probióticos em matrizes vegetais tem sido amplamente investigada nos últimos anos, visando alcançar o público que, em geral, não consome produtos de origem animal (MONTEMURRO et al., 2021). Alérgicos à proteína do leite, adeptos ao vegetarianismo e indivíduos lacto-intolerantes, não consomem leite ou derivados e podem encontrar dificuldade em ter acesso a alimentos probióticos (CSATLOS et al., 2023). Nesse contexto bebidas vegetais a base de castanhas e amêndoas tem se popularizado, a adição de frutas diversas pode inserir variedade sensorial, nutricional e aprimorar as características funcionais de promoção de saúde desses alimentos, além de proteger as bactérias durante o trânsito intestinal, melhorando sua bioacessibilidade (KIM; OH, 2024).

O consumo de alimentos fermentados baseados em matriz vegetal já demonstrou capacidade anti-inflamatória em doenças intestinais (CELIBERTO et al., 2017), modulação positiva da microbiota (DE CARVALHO MARCHESIN et al., 2018), melhora na sobrevivência e atividade anti-inflamatória na sepse (WANG et al., 2021) em modelos animais. Estes resultados em geral refletem a interação do probiótico com o organismo, diminuição da produção de

citocinas inflamatórias como TNF- α , e de radicais como óxido nítrico, porém os mecanismos envolvidos nesta interação nem sempre estão claros. Há evidências de que a fermentação da matriz vegetal gera compostos bioativos que melhoram as propriedades funcionais dos probióticos (SASI et al., 2023).

Através de ensaios *in vitro*, outros autores observaram o potencial funcional de probióticos isolados, ou associados a formulações alimentares através de redução de radicais livres pelo aumento do metabolismo de fenólicos (WU et al., 2023), biotransformação de moléculas para melhora da bioacessibilidade (DE ASSIS et al., 2021), e obtenção de metabólitos presentes no sobrenadante livre da cultura com atividade bactericida (EL-DEIN et al., 2021). Essa abordagem permite uma avaliação focada nos mecanismos aquém de interações multifatoriais e complexas com o organismo e permite investigá-los de forma aprofundada (PAPADIMITRIOU et al., 2015).

Recentemente nosso grupo desenvolveu duas bebidas mistas probióticas, uma contendo o extrato hidrossolúvel da amêndoa do babaçu e polpa de buriti, e outra com o extrato hidrossolúvel da amêndoa do babaçu e polpa de caju (MADEIRA, 2024). Adicionalmente, as bebidas foram avaliadas em um ensaio *in vivo* com tratamento profilático em camundongos da linhagem Swiss com posterior indução de sepse em modelo de ligadura e punção cecal (CLP), cujos resultados apontaram modulação do sistema imune dos camundongos sépticos (DIAS, 2023). Entretanto, os mecanismos envolvidos não estão claros. O objetivo deste estudo foi investigar o potencial funcional das duas bebidas mistas através da avaliação da viabilidade probiótica, citotoxicidade, atividade antioxidante, antimicrobiana, imunomoduladora e características físico-químicas antes e após a fermentação probiótica, e dessa forma fornecer evidências sobre os mecanismos envolvidos na obtenção dos benefícios associados ao seu consumo.

MÉTODOS

Preparo das bebidas mistas probióticas de extrato da amêndoa coco babaçu e caju ou buriti e obtenção do sobrenadante.

As bebidas mistas probióticas foram preparadas no laboratório de Química de Alimentos do Curso de Engenharia de Alimentos da Universidade Federal do Maranhão (UFMA). Dois tipos de bebidas mistas probióticas fizeram parte da avaliação, uma contendo extrato de coco babaçu e polpa de buriti e outra contendo extrato de coco babaçu e polpa de caju. As bebidas

foram elaboradas de acordo com condições pré-estabelecidas em registro de patente depositada no INPI (BR10202400376), sendo a bebida contendo extrato de coco babaçu e caju com 13,9% de polpa e 5,6 de pH inicial e daquela com extrato de coco babaçu e buriti com 13,7% de polpa e 6,2 de pH inicial. Para as duas bebidas, o tempo ideal de fermentação foi de 8 horas e a temperatura usada foi de 30°C. Para elaboração das bebidas probióticas, o caldo MRS contendo *Lc. casei* NRRL B-442 ativado foi inoculado na concentração de 7,00 log UFC/mL, que é a contagem mínima recomendada para os microrganismos probióticos exercerem seus efeitos benéficos (NUALKAEKUL; CHARALAMPOPOULOS, 2011). Após o processo de preparação e fermentação, as bebidas foram armazenadas sob congelamento (-18 °C). Bebidas mistas de babaçu e buriti e babaçu e caju não fermentadas foram usadas como controle. O sobrenadante foi obtido por centrifugação a 9.700 rpm (8000 x g) por 10 minutos a 4°C e em seguida filtrado em filtro bacteriológico de 0,22 µm para os experimentos com células, ou apenas centrifugado para os demais experimentos (MADEIRA, 2024).

Contagem de células viáveis do probiótico (*Lactocaseibacillus casei* NRRL B-442)

A viabilidade do probiótico foi determinada a partir da diluição seriada das bebidas até se obter a diluição 10^{-6} . Aliquotas de 0,1 mL das diluições foram semeadas em placas contendo MRS Agar (Agar De Man, Rogosa e Sharpe) em semeadura em superfície com auxílio de alça de Drigalski. As placas foram incubadas invertidas a 37 °C por 72 h. Após esse período, foi realizada contagem das colônias típicas de *Lc. casei* (PEREIRA et al., 2017).

Avaliação do pH

A determinação do pH das bebidas mistas de babaçu e buriti não fermentados (BBnF), babaçu e buriti fermentados (BBF), da bebida de babaçu e caju não fermentada (BCnF) e da bebida fermentada de babaçu e caju (BCF) foi realizada utilizando um potenciômetro equipado com eletrodo combinado (medidor de pH Mpa210, MS TECNOPON) devidamente calibrado mediante leitura direta (JEONG et al., 2022a).

Avaliação da Acidez

A determinação da acidez foi feita medindo o teor de ácido láctico presente em 1 mL da amostra diluída em água destilada, pela titulação com NaOH, usando 3 gotas de fenolftaleína

como indicador (KEMPKA et al., 2008).

Avaliação do teor de Fenólicos Totais

O método colorimétrico Folin-Ciocalteu foi adotado para avaliar a composição fenólica das bebidas. Adicionamos 100 μ L do sobrenadante puro das bebidas mistas a 1 mL de uma solução de 20% de carbonato de sódio, e 100 μ L de Folin-Ciocalteu (Vetec Química fina, Brazil), com água destilada até o volume final de 4 mL por tubo. As amostras foram então homogeneizadas em vórtex e armazenadas ao abrigo de luz por 2 horas. A leitura foi feita com absorbância de 760 nm em espectrofotômetro UV-vis (Gehaka UV-340G). A concentração de compostos fenólicos foi determinada usando uma curva padrão de ácido gálico e expressos como equivalente de ácido gálico por grama de amostra (LIMA et al., 2023).

Avaliação do teor de Flavonoides

O teor de flavonoides foi mensurado pelo método colorimétrico de cloreto de alumínio, que formam complexos estáveis com os flavonoides em metanol. Adicionamos 500 μ L do sobrenadante obtido por centrifugação, 500 μ L da solução metanólica de cloreto de alumínio hexahidratado (5%), a 3 mL de metanol. Após homogeneizar em vórtex, incubamos as amostras ao abrigo de luz por 30 minutos. Em seguida, os tubos foram centrifugados a 2000 rpm. A leitura foi feita em espectrofotômetro UV-Vis (Gehaka UV-340G) em 425 nm, e uma curva padrão de quercetina (Sigma-Aldrich, São Paulo, SP, Brasil) foi usada para determinar a concentração de flavonóides, expressos como equivalentes de quercetina por grama de amostra (DUTRA et al., 2023).

Cultura de células

Foram usados para os testes de citotoxicidade macrófagos da linhagem murina RAW 264.7 (doados pelo Laboratório de Farmacologia e Bioquímica do Núcleo de Pesquisa e Desenvolvimento de Medicamentos (NPDM) da Universidade Federal do Ceará – UFC, por meio da professora Nylane Maria Nunes de Alencar) e fibroblastos GM07492A (doados pelo Laboratório de Imunologia Aplicada ao Câncer (LIAC) da Universidade Federal do Maranhão – UFMA, por meio da professora Dra. Ana Paula Azevedo dos Santos) mantidos em garrafas de cultivo celular estéreis com meio DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle Medium*, Gibco™) contendo penicilina (100 μ g/mL), estreptomicina (100 U/mL), anfotericina B (0,25 μ g/mL),

suplementado com 10% de Soro Fetal Bovino (SFB) e para a cultura de RAW 1% de ácido pirúvico. Ambas as culturas foram mantidas em estufa a 5% de CO₂ e temperatura de 37 °C.

Ensaio de citotoxicidade

Placas de 96 poços foram preparadas com suspensões de células (10^5 para RAW, e 5×10^4 para GM, por poço), e incubadas por 2 horas (RAW) ou *overnight* (GM) para adesão. O sobrenadante centrifugado foi então diluído em uma proporção de 1:2 em meio DMEM, e filtrado com filtro bacteriológico de 0,22 µm, em seguida diluído de forma seriada (1:2, 1:4, 1:8, 1:16 e 1:32). As células foram incubadas com 100 µL das diluições por 24 horas. Foi realizado um ensaio de MTT (brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il) -2,5-difeniltetrazólio) para avaliar a viabilidade das células expostas ao sobrenadante das bebidas mistas pela redução do sal de tetrazólio amarelo em cristais de formazan de coloração púrpura por células metabolicamente ativas. Após 24 horas, o sobrenadante diluído em DMEM foi substituído por 90 µL de um novo meio e 10 µL de MTT, e incubadas novamente ao abrigo de luz por 3 horas. Após a incubação o meio foi retirado com cuidado para não remover os cristais de formazon gerados pela metabolização do MTT, e 100 µL de dimetilsulfóxido (DMSO) adicionados como diluente. As placas foram agitadas por 5 minutos e a absorbância avaliada por espectrofotômetro a 540 nm em leitor de microplaca BioTek® (JEONG et al., 2022a).

As concentrações que não apresentaram citotoxicidade significativa foram selecionadas para os ensaios de atividade antioxidante e imunomoduladora. Além disso, a viabilidade das células após a indução da inflamação foi avaliada por um novo ensaio de MTT, a fim de monitorar a relação entre a viabilidade celular e a produção de NO, bem como garantir que a exposição ao LPS não aumentou as taxas de morte celular.

Avaliação da Atividade Antioxidante

Avaliação da atividade antioxidante pelo sequestro do radical DPPH.

A capacidade antioxidante das bebidas mistas probióticas contra radicais DPPH (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl) foi avaliada em ensaio adaptado. O sobrenadante foi adicionado a uma solução de DPPH em metanol nas diluições 1:4, 1:8, 1:16 e 1:32, então incubados por 30 minutos em temperatura ambiente e ao abrigo de luz. Centrifugamos as amostras a 2.000 rpm após a incubação devido a presença de partículas no sobrenadante que tornariam a leitura inviável. A absorbância foi determinada em espectrofotômetro a 517 nm. Uma mistura de

metanol e DPPH foi usada como controle, e uma solução com o sobrenadante das bebidas fermentadas e metanol como branco (DUTRA et al., 2014).

Avaliação da atividade antioxidante pela inibição Peroxidação lipídica.

Uma adaptação do ensaio proposto por Upadhyay et. al (2014) foi usada para avaliar a capacidade de inibição da peroxidação lipídica das bebidas mistas. Na primeira parte do experimento, foi adicionado 100 µL de água destilada pura, 125 µL do sobrenadante diluído em água destilada para as concentrações de 1:4, 1:8, 1:16 e 1:32, mais 250 µL do substrato lipídico (solução de gema de ovo a 5%), e 25 µL do reagente de Fenton, preparado 1/1 com solução de sulfato ferroso (FeSO₄) e solução de peróxido de hidrogênio (H₂O₂) ambas a 0,14 M, responsável pela peroxidação da reação, e incubamos a solução ao abrigo de luz por 30 minutos. Em seguida, acrescentamos 750 µL de uma solução de ácido tiobarbitúrico (TBA) a 0,8%, 750 µL de ácido acético a 20%, e 25 µL de ácido tricloroacético (TCA) a 20%. A solução foi então levada ao banho maria a 95° por 60 minutos. Após a incubação em banho-maria, foi adicionado 3 mL de álcool butílico à solução e centrifugada a 3000 RPM por 15 minutos, em seguida a camada superior contendo o butanol foi avaliada quanto a absorbância por espectrofotometria em 532 nm.

Avaliação da atividade antimicrobiana

Microrganismos selecionados

A atividade antimicrobiana direta das bebidas mistas *in vitro* foi investigada contra os *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* e *Pseudomonas aeruginosa*. Estes microrganismos geralmente estão relacionados à sepse (FERREIRA et al., 2011).

Ensaio de concentração inibitória mínima.

O ensaio de concentração inibitória mínima (CIM), foi usado para avaliar a atividade antimicrobiana. Adicionamos uma diluição seriada do sobrenadante das bebidas (1:2, 1:4, 1:8, 1:16 e 1:32) em caldo Mueller Hinton, bem como uma suspensão contendo os microrganismos (*S. aureus*, *E. coli* ou *P. aeruginosa*) a placas de 96 poços, que em seguida foram incubadas em estufa a 37° C por 24 horas. Meio de cultura puro foi usado como controle negativo (Meio + bactéria), e uma solução com meio de cultura, antibiótico e bactérias como controle positivo

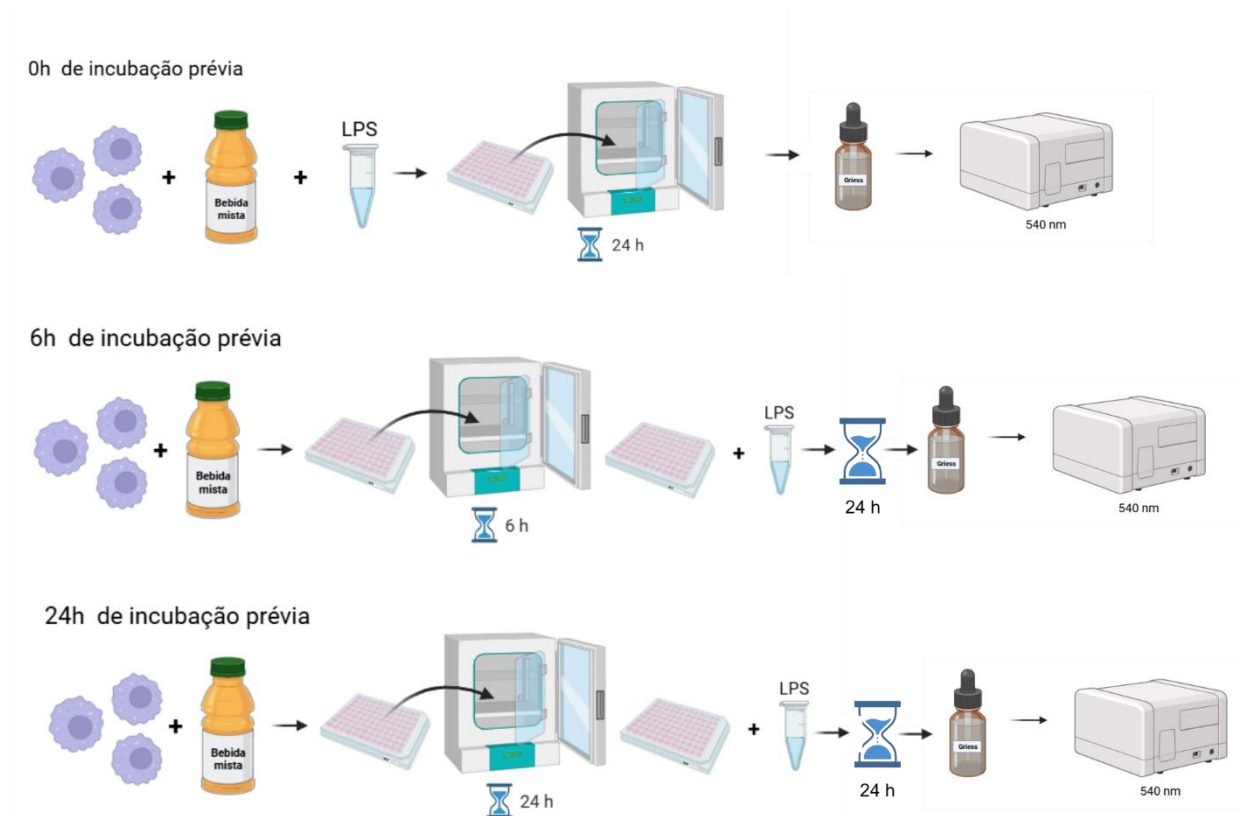
(Gentamicina+Bacteria). Os resultados foram avaliados por teste colorimétrico utilizando a resazurina como revelador da viabilidade celular bacteriana. O reagente foi adicionado aos poços e após 2 horas as reações colorimétricas avaliadas, sendo a cor azul indicativo de ausência de crescimento microbiano e a cor rosa de crescimento (OLIVEIRA-JÚNIOR et al., 2023).

Avaliação da atividade imunomoduladora

A capacidade de modular a ativação de macrófagos foi avaliada utilizando um ensaio de ativação de macrófagos por LPS para determinar a produção de óxido nítrico (NO) através da quantificação do nitrito pela reação de Griess. Macrófagos da linhagem murina RAW 264.7 foram usados nos testes. Microplacas de 96 poços foram preparadas contendo suspensão de células com 10^5 de macrófagos por poço para os tempos de pré-incubação de zero e seis horas, e 5×10^4 para o tempo de pré-incubação de 24 horas, e incubadas *overnight*. O sobrenadante foi submetido a diluição seriada (1:4, 1:8, 1:16 e 1:32) no meio DMEM. O tratamento ocorreu de duas formas, paralelo a indução da inflamação com LPS (0 H), ou na forma de pré-tratamento (profilática), com incubação de 6 (6 H) ou 24 horas (24 H) antes do estímulo com LPS, sendo que em ambas as formas as células permaneceram em incubação por mais 24 horas após o estímulo (Fig. 1). Células cultivadas em meio de cultura e solução de LPS foram utilizados como o grupo controle, ou apenas células e meio como controle negativo (NOH et al., 2022).

A produção de óxido nítrico foi estimada pela quantificação do nitrito, metabólito estável do NO. Transferimos 50 µl do sobrenadante de cada um dos poços para uma nova placa junto a 50 µL do reagente de Griess, incubados em seguida por 10 minutos ao abrigo da luz. A leitura da absorbância foi realizada por espectrofotômetro a 550 nm em leitor de microplaca BioTek® (NOH et al., 2022).

Figura 1 – Esquema de incubação para dosagem de NO



Fonte: Elaborado pelo autor (2025)

Análise estatística

Todos os testes foram feitos em triplicata e os resultados obtidos expressos com média e desvio padrão, e foram submetidos ao teste de normalidade, para análise posterior com os métodos correspondentes. Para todos os testes foi utilizado o software Graph Pad Prism, o teste foi versão 8.0, com um nível de significância de 5%, para amostra paramétricas com dois grupos foi usado o teste t de Student, para aquelas com mais de dois grupos foi usado ANOVA com teste post-hoc de Tukey's, e para testes não paramétricos Kruskal-Wallis com teste post-hoc de Dunn (SOKAL et al., 1987).

RESULTADOS

Contagem de células viáveis do microrganismo probiótico

Ambas as bebidas mistas se mostraram adequadas para o crescimento e manutenção da viabilidade dos probióticos inoculados, com crescimento superior a 8,77 Log UFC/mL para a bebida de babaçu e buriti, e 8,64 Log UFC/mL para a bebida de babaçu e caju (MADEIRA, 2024).

Análise físico-química e dosagem de Fenólicos e Flavonoides

Avaliação de pH e Acidez

O conteúdo de ácidos aumentou após a fermentação da matriz, refletindo uma diminuição do pH como exposto na Tabela 1.

Tabela 1 – Valor de pH e Acidez das bebidas mistas de coco babaçu e buriti e coco babaçu e caju antes e após a fermentação com *Lactocaseibacillus casei*.

Bebida	Acidez (g de ácido láctico/100 mL)	Valor de pH
BBnF	2,24 ± 0,42	5,23 ± 0,14
BBF	3,00 ± 0,36	3,84 ± 0,09*
BCnF	2,94 ± 0,23	4,75 ± 0,03
BCF	3,24 ± 0,18	3,86 ± 0,03*

BBnF: bebida de Babaçu e Buriti não fermentada

BBF: bebida de Babaçu e Buriti Fermentada

BCnF: bebida de Babaçu e Caju não fermentada

BCF: bebida de Babaçu e Caju Fermentada

Os resultados representam a média ± DP. As diferenças entre cada grupo foram determinadas pelo teste paramétrico t de Student, Médias seguidas por * diferem significativamente entre si (p < 0,05).

Dosagem de compostos fenólicos e flavonóides

A dosagem do teor de compostos fenólicos e flavonoides demonstrou uma queda na concentração após a inoculação e fermentação probiótica (Tabela 2).

Tabela 2 – Conteúdo total de compostos fenólicos e flavonoides expressos em mg EAG/g

amostra e mg EQ/g amostra, respectivamente das bebidas mistas de coco babaçu e buriti e coco babaçu e caju antes e após a fermentação com *Lacticaseibacillus casei*.

Bebida	C. Fenólicos (mg EAG g ⁻¹)	Flavonoides (mg EQ g ⁻¹)
BBnF	12,0 ± 0,02 ^a	0,216 ± 0,005 ^a
BBF	8,4 ± 0,02 ^b	0,152 ± 0,003 ^b
BCnF	14,0 ± 0,03 ^a	0,268 ± 0,003 ^a
BCF	8,8 ± 0,02 ^b	0,152 ± 0,005 ^b

BBnF: bebida de Babaçu e Buriti não fermentada

BBF: bebida de Babaçu e Buriti Fermentada

BCnF: bebida de Babaçu e Caju não fermentada

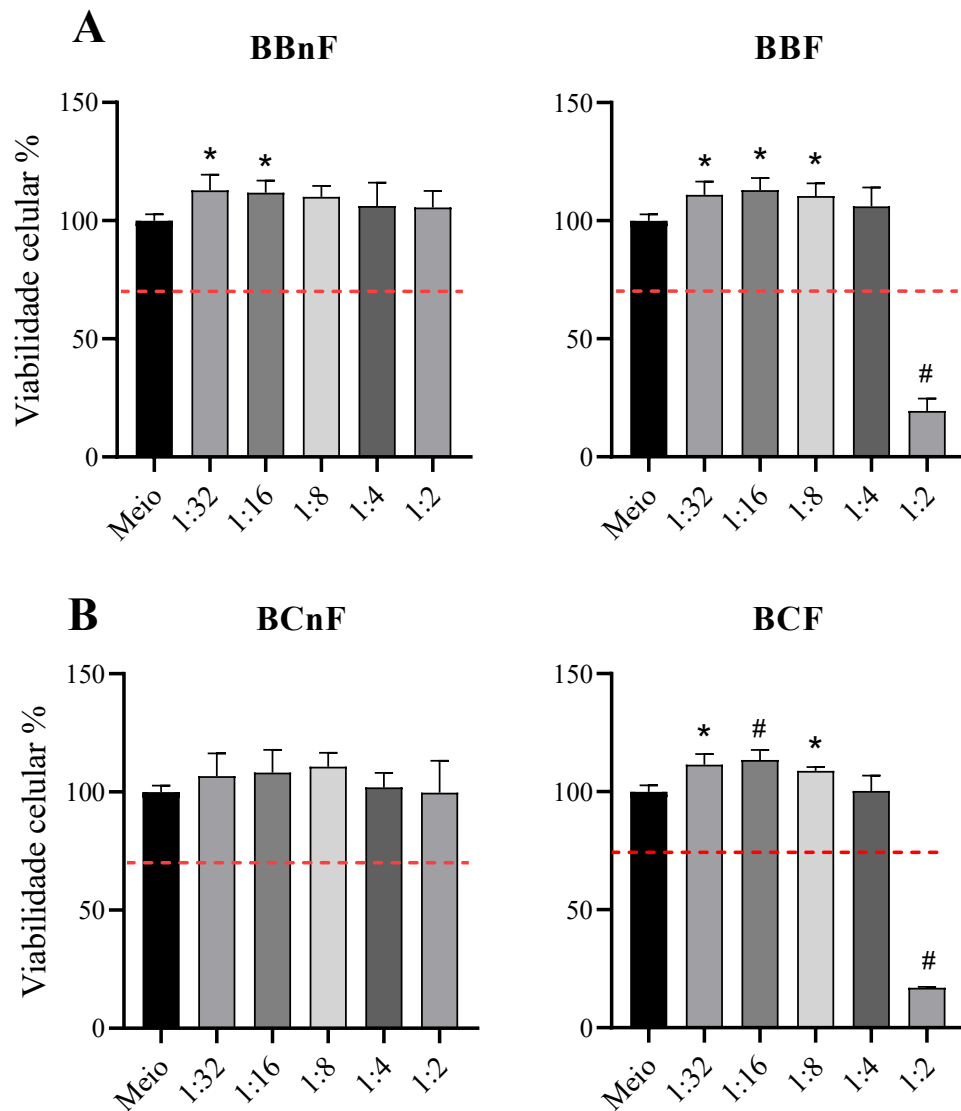
BCF: bebida de Babaçu e Caju Fermentada

Os resultados representam a média ± DP. As diferenças entre cada grupo foram determinadas pelo teste paramétrico t de Student, Médias seguidas por * diferem significativamente entre si (p < 0,05).

Avaliação de citotoxicidade

Figura 2 – Ensaio de citotoxicidade em **GM07492A** das bebidas mistas de coco babaçu e buriti e coco babaçu e caju antes e após a fermentação com *Lacticaseibacillus casei*.

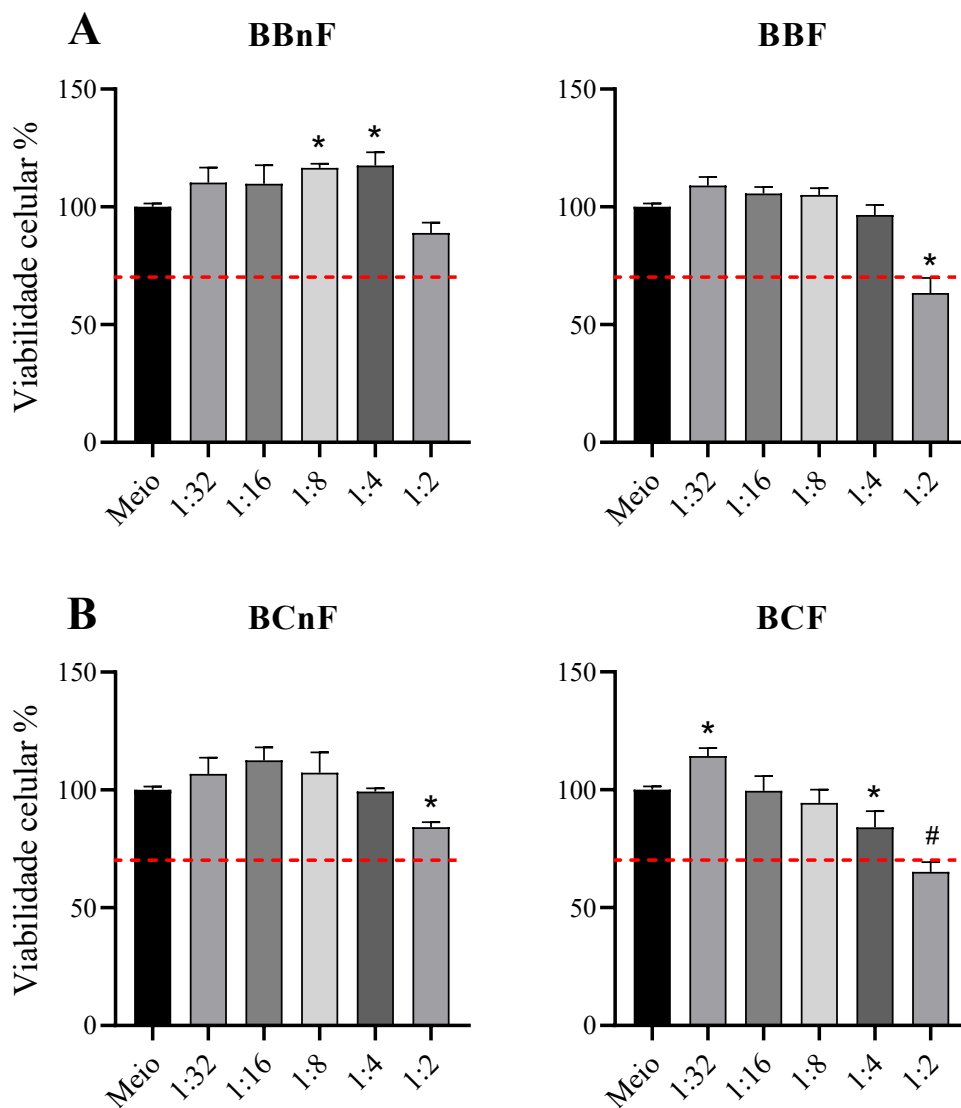
GM07492A



Fibroblastos GM07492A (5×10^4 por poço) foram incubados com diluições do sobrenadante das bebidas mistas (1:2, 1:4, 1:8, 1:16 e 1:32) por 24 horas, submetidos em seguida a um ensaio de MTT ($10 \mu\text{L}$), e incubados por 3 horas. A absorbância foi avaliada por espectrofotômetro a 540 nm em leitor de microplaca. **A** – BBnF (bebida de Babaçu e Buriti não fermentada) e BBF (bebida de Babaçu e Buriti Fermentada); **B** – BCnF (bebida de Babaçu e Caju não fermentada) e BCF (bebida de Babaçu e Caju Fermentada). As diferenças entre cada grupo foram determinadas pelo teste paramétrico ANOVA, os dados estão apresentados como média $\pm$ SEM de poços triplicados e são representativos de dois experimentos independentes; * $p \leq 0,05$ e # $p \leq 0,0001$ em relação ao grupo controle ($0 \mu\text{g/mL}$).

Figura 3 – Ensaio de citotoxicidade em RAW 264.7 das bebidas mistas de coco babaçu e buriti e coco babaçu e caju antes e após a fermentação com *Lacticaseibacillus casei*.

RAW 264.7



Macrófagos Raw 264.7 (10^5 por poço) foram incubados com diluições do sobrenadante das bebidas mistas (1:2, 1:4, 1:8, 1:16 e 1:32) por 24 horas, submetidos em seguida a um ensaio de MTT ($10\mu\text{L}$), e incubados por 3 horas. A absorbância foi avaliada por espectrofotômetro a 540 nm em leitor de microplaca. **A** – BBnF (bebida de Babaçu e Buriti não fermentada) e BBF (bebida de Babaçu e Buriti Fermentada); **B** – BCnF (bebida de Babaçu e Caju não fermentada) e BCF (bebida de Babaçu e Caju Fermentada). As diferenças entre cada grupo foram determinadas pelo teste paramétrico ANOVA, os dados estão apresentados como média $\pm$ SEM de poços triplicados e são representativos de dois experimentos independentes; * $p \leq 0,05$ e # $p \leq 0,0001$ em relação ao grupo controle ($0\mu\text{g/mL}$).

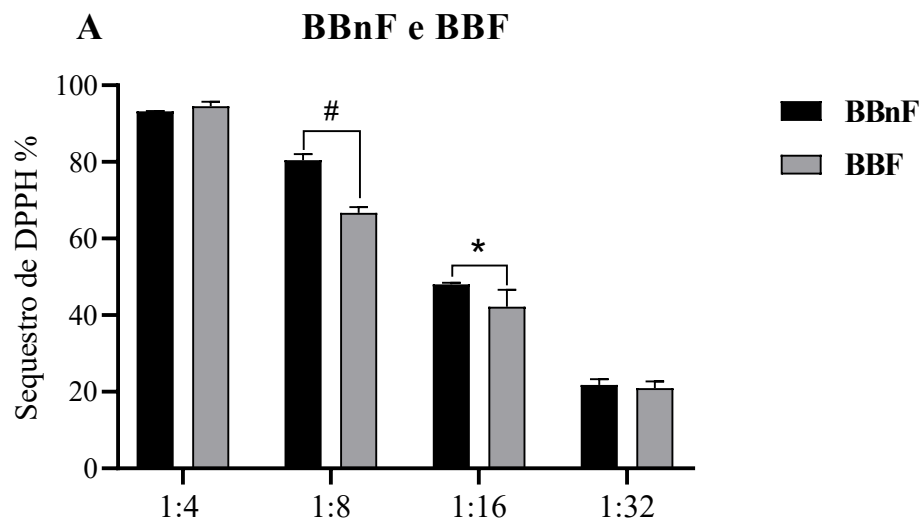
No ensaio de citotoxicidade com GM07492A, a maior concentração (1:2) apresentou toxicidade significativa (# $p < 0,0001$) para ambos os fermentados, enquanto nas demais concentrações a viabilidade celular foi superior a 80%. Foi observado proliferação celular significativa em 1:8, 1:16 e 1:32. Já as bebidas não fermentadas não apresentaram toxicidade

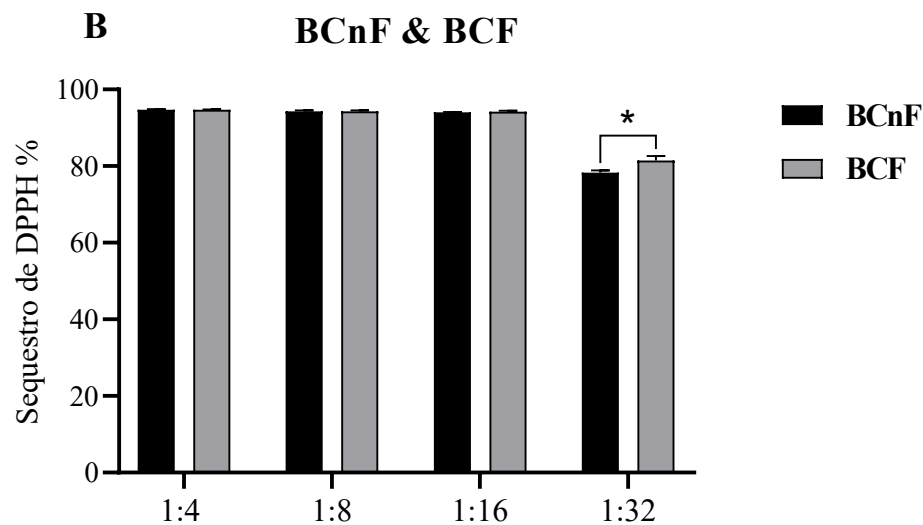
em nenhuma das concentrações avaliadas, e apenas a bebida não fermentada com buriti expressou proliferação celular significativa (1:16 e 1:32) (Fig.2).

Os resultados do ensaio de citotoxicidade com RAW 264.7 foram semelhantes, as bebidas probióticas tiveram toxicidade significativa na maior concentração (1:2) para ambas (* $p < 0,05$ e # $p < 0,0001$), e 1:4 em BCF. A bebida fermentada de caju também ocasionou a proliferação celular significativa em 1:32. Já o não fermentados não ocasionaram morte celular significativa em nenhuma das concentrações, com proliferação celular para BBnF em 1:4 e 1:8. (Fig. 3).

Atividade antioxidante

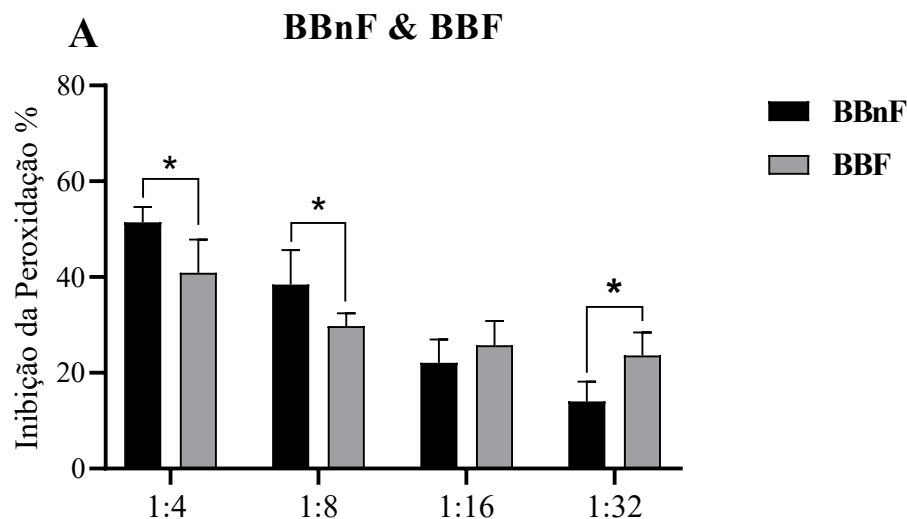
Figura 4 – Atividade antioxidante pelo sequestro do radical **DPPH** das bebidas mistas de coco babaçu e buriti e coco babaçu e caju antes e após a fermentação com *Lacticaseibacillus casei*.

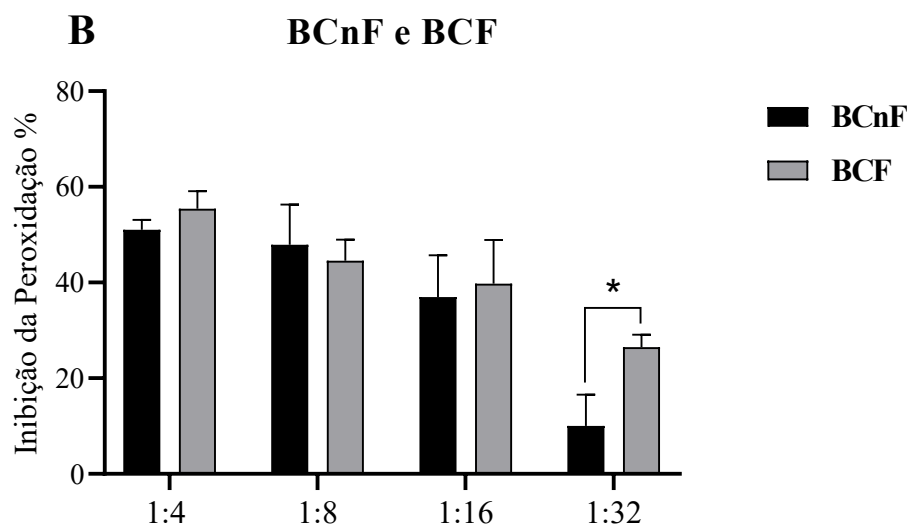




O sobrenadante das bebidas (1:4, 1:8, 1:16 e 1:32) foi avaliado contra o radical DPPH. Após incubação (30 min.) e centrifugação, as amostras foram analisadas por espectrofotometria a 517 nm. Utilizou-se controle com DPPH e branco com metanol. A – BBnF (bebida de Babaçu e Buriti não fermentada) e BBF (bebida de Babaçu e Buriti Fermentada); B – BCnF (bebida de Babaçu e Caju não fermentada) e BCF (bebida de Babaçu e Caju Fermentada). As diferenças entre cada grupo foram determinadas pelo teste paramétrico ANOVA, os dados estão apresentados como média $\pm$ SEM de poços triplicados e são representativos de dois experimentos independentes; * $p \leq 0,05$ e # $p \leq 0,0001$ em relação ao grupo controle (0 $\mu\text{g/mL}$).

Figura 5 – Atividade antioxidante pela Inibição da **Peroxidação Lipídica** das bebidas mistas de coco babaçu e buriti e coco babaçu e caju antes e após a fermentação com *Lactocaseibacillus casei*.





Foi utilizado um ensaio adaptado para avaliar a inibição da peroxidação lipídica, empregando um substrato lipídico e o reagente de Fenton como indutor oxidativo. Após a incubação com os sobrenadantes nas diluições 1:4, 1:8, 1:16 e 1:32, o complexo TBA-MDA formado foi extraído com butanol e quantificado por espectrofotometria a 532 nm. **A** – BBnF (bebida de Babaçu e Buriti não fermentada) e BBF (bebida de Babaçu e Buriti Fermentada); **B** – BCnF (bebida de Babaçu e Caju não fermentada) e BCF (bebida de Babaçu e Caju Fermentada). As diferenças entre cada grupo foram determinadas pelo teste paramétrico ANOVA, os dados estão apresentados como média $\pm$ SEM de poços triplicados e são representativos de dois experimentos independentes; * $p \leq 0,05$ e # $p \leq 0,0001$ em relação ao grupo controle (0 $\mu\text{g/mL}$).

Todas as bebidas apresentaram atividade antioxidante. No ensaio contra radicais DPPH a atividade antioxidante das bebidas mistas de babaçu e buriti foi dependente da dose. A bebida de buriti e babaçu não fermentada obteve melhor desempenho de sequestro de radicais do que a bebida fermentada de forma geral, com atividade antioxidante significativamente superior ($p < 0,05$) nas diluições de 1:8 e 1:16. As bebidas de caju e babaçu demonstraram alta capacidade antioxidante em todas as concentrações. O fermentado de caju e babaçu foi significativamente melhor na menor diluição em relação a não fermentada (Fig. 4).

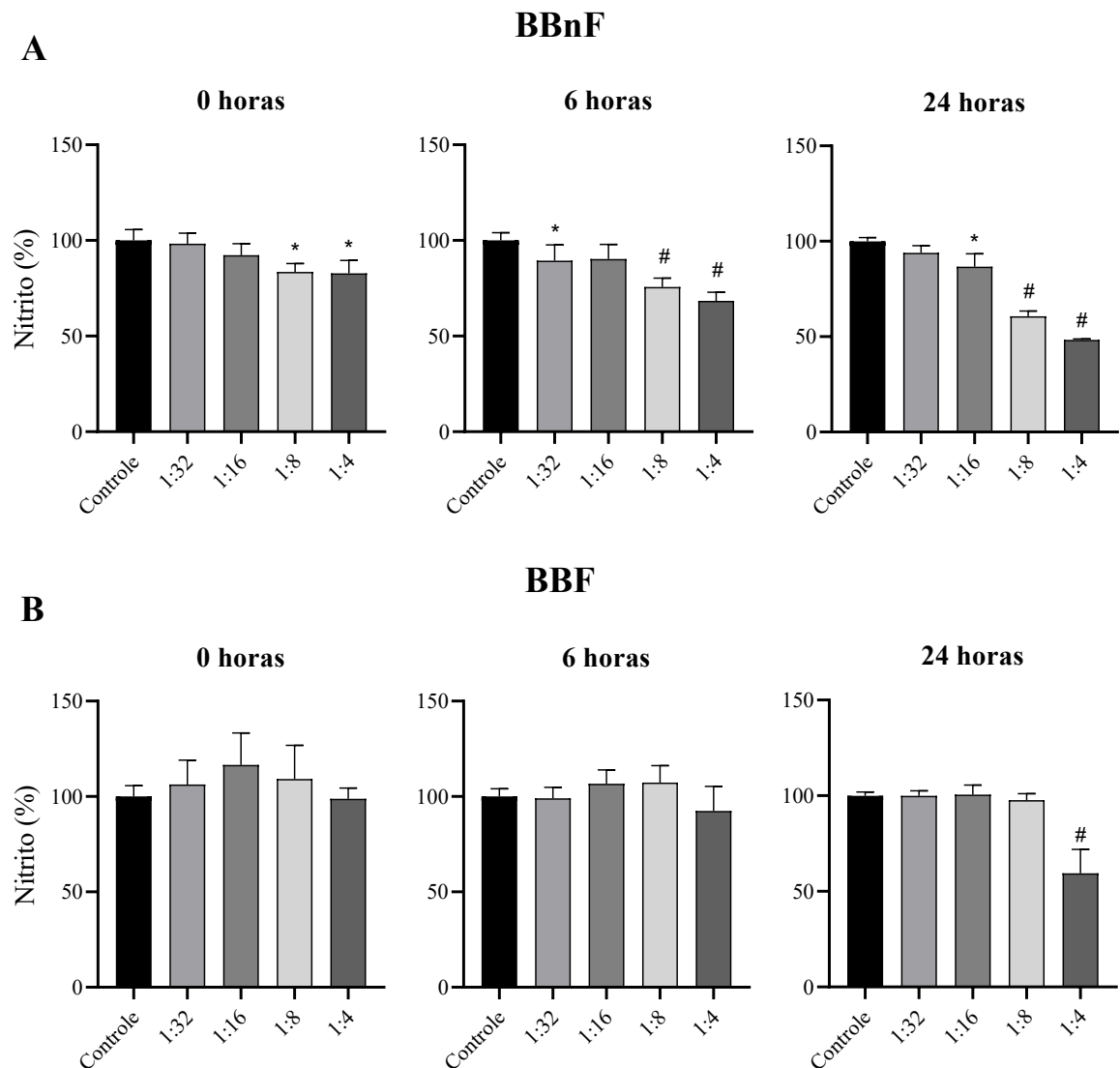
A bebida mista de babaçu e buriti não fermentada obteve melhor capacidade de inibição da peroxidação em comparação a bebida probiótica, especialmente nas diluições 1:4 e 1:8, enquanto na concentração 1:32 o fermentado foi melhor. Para as bebidas de caju e babaçu o fermentado se manteve próximo ou melhor que o não fermentado, e na razão 1:32 foi significativamente melhor ($p < 0,05$) (Fig. 5).

Atividade antibacteriana

As bebidas mistas não apresentaram atividade antimicrobiana em nenhuma das concentrações avaliadas (1:2, 1:4, 1:8, 1:16 e 1:32), antes ou após a fermentação probiótica.

Atividade imunomoduladora

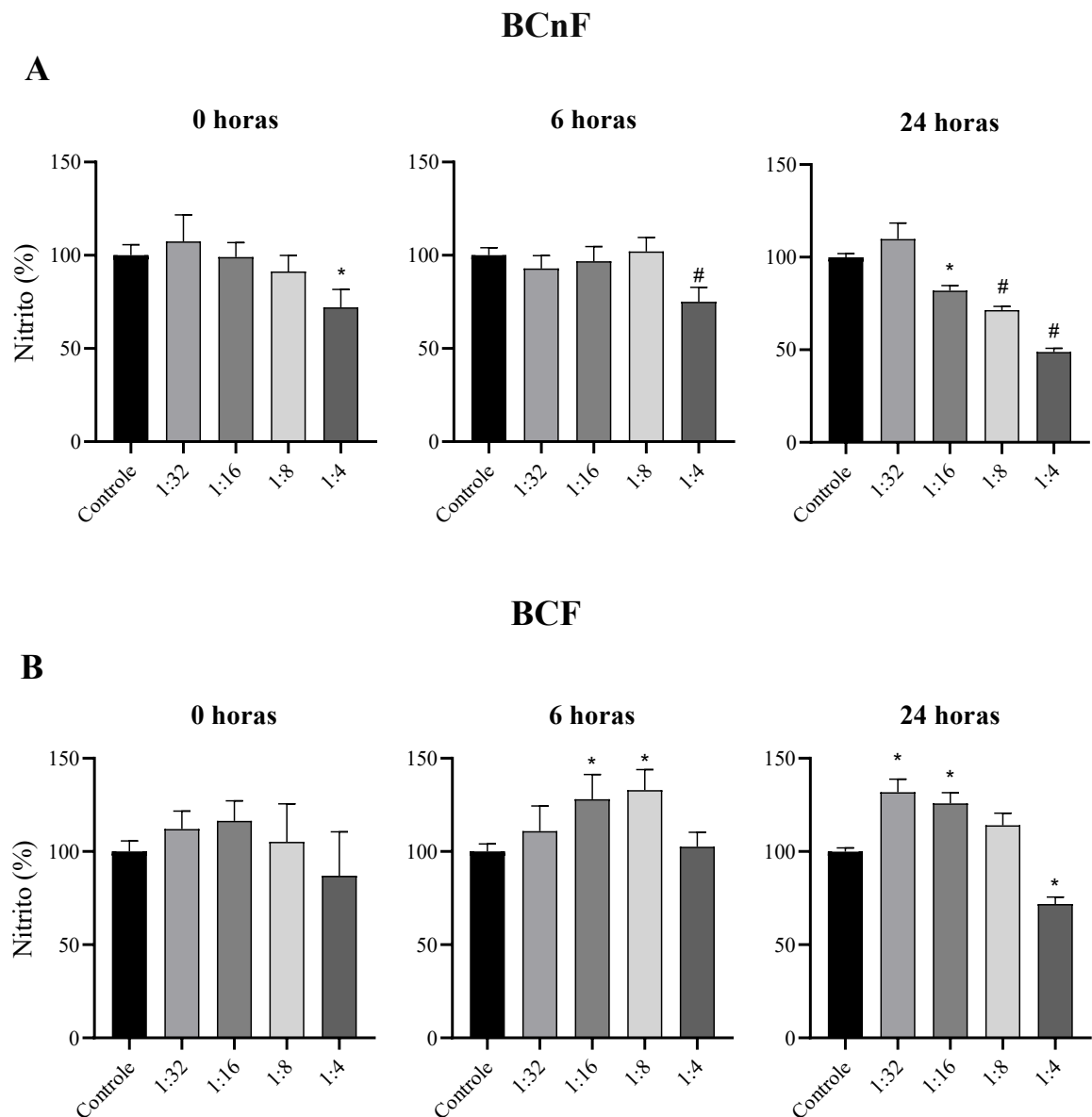
Figura 6 – Dosagem de Óxido Nítrico para as bebidas de babaçu e buriti, comparação entre tempo de pré-exposição.



Foi utilizado um ensaio de ativação de macrófagos da linhagem RAW 264.7, estimulados com LPS. As bebidas foram testadas em diferentes diluições (1:4, 1:8, 1:16 e 1:32) como tratamento simultâneo (0 h) ou pré-tratamento (6 h e 24 h). A produção de óxido nítrico, marcador inflamatório, foi quantificada indiretamente pela dosagem de nitrito por reação de Griess e leitura espectrofotométrica a 550 nm. **A** – BBnF (bebida de Babaçu e Buriti não fermentada); **B** – BBF (bebida de Babaçu e Buriti Fermentada). As diferenças entre cada grupo foram determinadas pelo teste paramétrico ANOVA, os dados estão apresentados como média $\pm$ SEM de poços triplicados e são representativos de dois experimentos independentes; * $p \leq 0,05$ e # $p \leq 0,0001$ em relação ao grupo controle (0 $\mu\text{g/mL}$).

A bebida não fermentada de babaçu e buriti diminuiu a produção de óxido nítrico na concentração de 1:4 e 1:8 em todos os tempos de exposição de forma significativa (* $p \leq 0,05$ para 0 horas e # $p \leq 0,0001$ para 6 e 24 horas de pré-exposição), com seis horas de pré-incubação também houve redução em 1:32 (* $p \leq 0,05$) e com 24 horas também reduziu em 1:16 (* $p \leq 0,05$) (Fig. 6). A bebida fermentada de babaçu e buriti não afetou significativamente a produção do óxido nítrico em incubação simultânea (0 horas), ou em pré-incubação de seis horas (6 horas), já com 24 horas de pré-incubação houve redução significativa do radical em 1:4 (* $p \leq 0,05$) (Fig. 6)

Figura 7 – Dosagem de Óxido Nítrico para as bebidas de babaçu e caju, comparação entre tempo de pré-exposição.



Foi utilizado um ensaio de ativação de macrófagos da linhagem RAW 264.7, estimulados com LPS. As bebidas foram testadas em diferentes diluições (1:4, 1:8, 1:16 e 1:32) como tratamento simultâneo (0 h) ou pré-tratamento (6 h e 24 h). A produção de óxido nítrico, marcador inflamatório, foi quantificada indiretamente pela dosagem de nitrito por reação de Griess e leitura espectrofotométrica a 550 nm. **A** – BCnF (bebida de Babaçu e Buriti não fermentada); **B** – BCF (bebida de Babaçu e Buriti Fermentada). As diferenças entre cada grupo foram determinadas pelo teste paramétrico ANOVA, os dados estão apresentados como média $\pm$ SEM de poços triplicados e são representativos de dois experimentos independentes; * $p \leq 0,05$ e # $p \leq 0,0001$ em relação ao grupo controle (0 $\mu\text{g/mL}$).

A bebida não fermentada de babaçu e caju diminuiu a produção de óxido nítrico na concentração de 1:4 em todos os tempos de exposição de forma significativa (* $p \leq 0,05$ para 0 horas e # $p \leq 0,0001$ para 6 e 24 horas de pré-exposição), e quando incubada 24 horas antes do estímulo com LPS, também houve diminuição da produção do radical nas concentrações de 1:8 (# $p \leq 0,0001$) e 1:16 (* $p \leq 0,05$) (Fig. 7). Já a bebida fermentada de babaçu e caju não interferiu significativamente na produção de NO em incubação simultânea (0 horas), porém estimulou a produção do radical com seis horas de pré-exposição para 1:8 e 1:16 (* $p \leq 0,05$), enquanto com 24 horas de pré-exposição o aumento na produção do radical foi observado nas menores concentrações, 1:16 e 1:32 (* $p \leq 0,05$), e reduziu a produção em 1:4 (Fig. 7).

DISCUSSÃO

A fermentação das bebidas mistas pelo probiótico *Lacticaseibacillus casei* alterou significativamente tanto componentes bioativos quanto suas propriedades funcionais.

O crescimento e a manutenção dos probióticos é determinante para a avaliação de novos substratos capazes de carrear os microrganismos, uma vez que, para ser considerado probiótico e, portanto, ter impacto fisiológico contagens acima de 7 Log UFC/mL são recomendadas (PEREIRA et al., 2013). As duas bebidas mistas se mostraram adequadas para o crescimento e manutenção da viabilidade dos probióticos inoculados, com crescimento superior a 8,00 Log UFC/mL. O crescimento e viabilidade dos probióticos na matriz vegetal encontra maiores desafios em relação aos produtos lácteos, pois a acidez do meio vegetal pode influenciar a proliferação e sobrevivência das bactérias. Além disso, temperatura, a cepa usada e sua capacidade de usar a matriz vegetal como substrato durante a fermentação, também são fatores de grande importância para a obtenção de um substrato adequado para a formulação de bebidas probióticas vegetais (PEREIRA et al., 2013; PEREIRA; MACIEL; RODRIGUES, 2011).

Esse resultado pode ter sido proporcionado pelas características dessas matérias-primas, visto que o extrato do coco babaçu é rico em carboidratos e fibras que podem atuar como prebióticos, assim como o Buriti, enquanto o suco de caju já foi avaliado anteriormente como

substrato adequado para o crescimento probiótico, alcançando valores semelhantes de células viáveis (PEREIRA; MACIEL; RODRIGUES, 2011; SINGH et al., 2019).

Lactobacillus casei NRRL B-442, probiótico usado nas bebidas estudadas, é uma bactéria produtora de ácido láctico, que durante a fermentação produz ácido láctico como metabólito (GUAN; XIONG; XIE, 2021). O aumento predominante do ácido láctico nas bebidas mistas fermentadas ocasiona a diminuição do pH (Tabela 2). O aumento na acidez incorpora algumas das principais características sensoriais de bebidas fermentadas, como o sabor ácido e o aroma de fermentado, bem como pode melhorar a conservação, pois reduzir a contaminação por bactérias patogênicas que tem como pH neutro, o ponto ótimo para crescimento (GUAN; XIONG; XIE, 2021).

Entretanto, o aumento da acidez após a fermentação pode ter afetado a viabilidade celular pela acidificação do meio de cultura. Ambas as bebidas não fermentadas não apresentaram toxicidade significativa em RAW ou GM, enquanto as bebidas probióticas apresentaram viabilidade celular inferior a 70% na maior concentração (1:2). Este resultado pode ser atribuído ao baixo pH dos fermentados, decorrente do aumento do ácido láctico após a fermentação. Os protocolos para a manutenção das culturas recomendam o pH ideal geralmente próximo do neutro (7,0~7,4) (ATCC, 2025). Resultados semelhantes foram encontrados por Fochesato et al., 2020 avaliaram a viabilidade de uma mistura probiótica para uso como suplemento alimentar em células Vero, com a porcentagem de células viáveis inferior a 20% na maior concentração, que o autor também relacionou a presença aumentada de ácido láctico no meio de cultura e consequente diminuição do pH.

As demais diluições apresentaram boa viabilidade em comparação ao controle. As bebidas fermentadas influenciaram positivamente a proliferação celular, um forte indicativo de que são um substrato nutritivo apropriado. Outro estudo com bebidas probióticas, este a base de sementes, raízes, tubérculos e partes aéreas de várias plantas obteve resultados semelhantes com estímulo a proliferação das células (BOY et al., 2021; MAO; ZHANG; XU, 2020).

Além da acidez, a fermentação influenciou o teor de compostos fenólicos totais e flavonoides, que diminuíram após a fermentação dos probióticos (Tabela 3). Os compostos fenólicos e flavonoides são produzidos pelo metabolismo secundário das plantas por várias vias bioquímicas, e desempenham diversas funções vitais para os organismos vegetais (ROCCHETTI et al., 2022). A diminuição dos compostos fenólicos após a fermentação já foi observada em outros estudos com bebidas probióticas vegetais. De forma geral, ocorre uma variação significativa desses bioativos em relação ao tempo de fermentação, com aumento nos primeiros dias, como observado por Wang et al. (2022) em seu estudo com *Perilla frutescens*

fermentada, e diminuição em períodos mais longos de fermentação e armazenamento (WANG et al., 2022; ZHAO et al., 2021).

Entretanto, embora tenha ocorrido uma redução no teor de compostos fenólicos, a atividade antioxidante foi observada tanto nas bebidas não fermentadas quanto nas fermentadas. A fermentação probiótica metaboliza os componentes da matriz vegetal, inclusive compostos fenólicos, quebrando moléculas maiores em frações menores (ZHONG et al., 2021). Diferentes cepas probióticas metabolizam os compostos da matriz vegetal de formas distintas através da produção enzimática e da variação das vias metabólicas (LEONARD et al., 2021). A produção de hidrolases, pode alterar a composição fenólica pela quebra de grandes moléculas em unidades menores, mais reativos e antioxidantes, redutase e carboxilase influenciam a biotransformação pelo equilíbrio de NADH/NAD⁺. Cepas de *Lactobacillus paracasei* produzem maiores quantidades de β -glicosidase e β -galactosidase em relação a outros gêneros probióticos (WU et al., 2023).

O Caju, além de polifenóis como os taninos em sua composição, é rico em ácido ascórbico (CRUZ REINA et al., 2022). Pereira et al., 2013 avaliaram a estabilidade dos bioativos de uma bebida probiótica de caju, e relataram uma menor diminuição do conteúdo de ácido ascórbico na bebida fermentada em relação a não fermentada, e resultados semelhantes para a atividade antioxidante após o período de armazenamento de 42 dias. Esses dados corroboram nossos resultados com a bebida de caju, que se manteve com alta atividade antioxidante mesmo com a queda significativa de fenólicos e flavonoides após a fermentação.

A atividade antioxidante de produtos funcionais como as bebidas probióticas, embora não possam ser consideradas tratamento, são adjuvantes e participam da promoção da saúde, especialmente auxiliando no controle de espécies reativas de oxigênio (ERO) livres no organismo (AKBARI et al., 2022). O estresse oxidativo está presente em diversas doenças ligadas a processos inflamatórios, de caráter agudo como a sepse ou crônico como doença de Crohn (ALZOGHAIBI, 2013). O aumento da peroxidação lipídica progride paralelo a gravidade do quadro séptico, e está profundamente relacionada a encefalopatia associada a sepse (WANG et al., 2024). Nossos resultados mostram atividade antioxidante significativa contra a oxidação de moléculas lipídicas. A peroxidação lipídica é um dos principais mecanismos causadores de danos celulares, gera instabilidade na bicamada lipídica, perda da seletividade, danos ao material genético e em alguns casos morte celular. A inibição desse processo além de caráter antioxidante também exerce efeito anti-inflamatório (XIE et al., 2023).

Ainda no contexto da sepse, sua etiologia é em grande parte bacteriana. Estima-se que 62,2% dos quadros de sepse são causados por bactérias Gram-negativas como *Pseudomonas* e

E. coli, e outros 46,8% por Gram-positivas como *S. aureus* (MAYR; YENDE; ANGUS, 2013).. As bactérias produtoras de ácido láctico como lactobacilos, utilizam diversos mecanismos antagônicos à patógenos no TGI, desde competição por adesão ao epitélio, estimulação imunológica a produção de bacteriocinas, peptídeos com atividade bactericida (VAN ZYL; DEANE; DICKS, 2020). Entretanto, as bebidas mistas, seja fermentada ou não fermentada, não apresentaram atividade antimicrobiana em nenhuma das concentrações avaliadas.

Esses resultados não são inéditos, Silva et al., 2023 avaliaram a atividade antimicrobiana de um suco de Cupuaçu fermentado com *Lactiplantibacillus plantarum* Lp62, em seus achados, o probiótico testado diretamente em *E. coli*, *P. aeruginosa* e *S. enteritidis* apresentou atividade bactericida, entretanto o suco fermentado não foi capaz de inibir nenhum dos microrganismos. Os autores associaram esse resultado ao curto tempo de fermentação, que para o suco de cupuaçu foi de 24 horas, enquanto as bebidas mistas de babaçu e buriti ou caju tiveram um tempo de fermentação de 8 horas. Outros autores que avaliaram a atividade antimicrobiana e obtiveram resultados positivos tiveram tempo de fermentação superior, de 48 horas (LIU et al., 2018) e até seis meses (ZHAO et al., 2021). Porém, o fator tempo de fermentação deve ser levado com cuidado, já que em outros casos, o menor tempo também foi associado a melhor disponibilidade de compostos bioativos, além de ser dependente da cepa e da matriz vegetal, porém é determinante na alteração da composição de metabólitos dos fermentados (RU et al., 2022).

A ação antibacteriana de probióticos está associada ao ácido láctico, entre outros metabólitos como bacteriocinas (MAO; ZHANG; XU, 2020). O conteúdo de ácido láctico aumentou nas bebidas mistas probióticas após a fermentação, logo, o efeito antimicrobiano dos fermentados não é completamente dependente deste componente, uma vez que não apresentaram qualquer inibição contra os patógenos testados. As bacteriocinas, embora apresentem ação microbicida direta, também atuam influenciando o sistema imunológico (BENÍTEZ-CHAO et al., 2021). A nisina, bacteriocina da classe dos lantibióticos, já demonstrou efeitos proliferativos de TCD4⁺ e CD8⁺, além de propriedades quimioatraentes (THODA; TOURAKI, 2023b).

Os mecanismos de ação bactericida dos fermentados, podem estar atrelados a fatores mais complexos do organismo. Além disso, mesmo as bebidas mistas não fermentadas não demonstraram potencial de inibição dos microrganismos, o que pode ser um indicativo de que a matriz não possua componentes favoráveis a atividade bactericida. Em nossos resultados anteriores, os camundongos com sepse induzida por ligadura e punção cecal (CLP) tratados com as bebidas probióticas de babaçu e buriti ou caju tiveram uma diminuição significativa da

disseminação polimicrobiana no sangue, porém valores semelhantes de UFC no peritônio entre os grupos tratado e não tratado (DIAS, 2023). Estes resultados se relacionam aos obtidos neste trabalho, pois refletem uma ação antimicrobiana indireta, possivelmente através de ativação de vias imunes, melhora na permeabilidade intestinal ou na alteração da população de bactérias colonizando o intestino.

Evidências da atividade imunomoduladora das bebidas mistas podem ser observadas em nossos achados de dosagem de Óxido Nítrico. As bebidas não fermentadas foram capazes de reduzir a produção do radical NO em incubação simultânea ao estímulo com LPS, e a redução aumentou conforme maior o tempo de pré-tratamento das células. Já os fermentados reduziram a produção do NO apenas na maior concentração com 24 horas de pré-incubação, e estimulou a produção do radical em diluições maiores. Entre os componentes com atividade imunomoduladora presentes nas bebidas mistas, os compostos fenólicos são frequentemente associados a potencial de inibição do óxido nítrico pela regulação da sinalização das vias bioquímicas presentes no processo inflamatório (AMBRIZ-PÉREZ et al., 2016).

Entre os achados de Limtrakul et. al. (2016) com extratos ricos em proantocianidinas derivadas de uma variedade de arroz vermelho, houve a redução da expressão da Oxido nítrico sintase (iNOS) e ciclooxigenase-2 (COX2), bem como inibição da ativação de fatores de transcrição como AP-1 e NF-kB em células Raw 264.7 induzidas por LPS. De forma semelhante, um estudo com macrófagos peritoniais pré-incubados com uma mistura de carotenoides e fenólicos e posteriormente ativados por LPS resultou na inibição da produção de mediadores inflamatórios como NO, superóxido e prostaglandinas pela inibição da atividade de enzimas de NOX2 NADPH oxidase, INOS e COX2, demonstrando efeito sinérgico da combinação destes bioativos também presentes nas frutas usadas nas bebidas mistas (HADAD; LEVY, 2012). A concentração fenólica diminuiu após a fermentação, o que deve estar relacionado à redução do potencial anti-inflamatório dos fermentados de forma direta.

A produção do NO em nossos achados diminuiu significativamente conforme o tempo de pré-tratamento aumentou. Alguns autores associam resultados semelhantes de redução de NO pelo efeito da pré-exposição na inibição das vias de sinalização para a cascata inflamatória, como proteossoma e a fosforilação de proteínas presentes na via de NF-kB (QURESHI et al., 2011), e a pré-ativação de vias protetoras antioxidantes como Nrf2/HO-1 (HAN et al., 2021).

Os fermentados inibiram a produção de óxido nítrico apenas após 24 horas de pré-tratamento, o que indica que a fermentação não apenas não potencializou a capacidade de inibição da produção do NO diretamente, como também diminuiu. A queda no teor de compostos fenólicos pós-fermentação pode estar relacionada a redução dessa bioatividade, bem

como a transformação de outros componentes da matriz e incorporação de metabólitos do probiótico. O aumento no teor de ácido láctico após a fermentação pode ser um dos fatores associados regulação da produção do radical após longo tempo de exposição. Em um estudo com culturas de macrófagos RAW 264.7 em meio de cultura suplementado com ácido láctico, foi observado uma menor produção de NO, IL-6 e IL-10 (KELLUM; SONG; LI, 2004) enquanto em outro houve a redução de TNF- α com pré acidificação da cultura entre 18 e 20 horas antes do estímulo inflamatório (DIETL et al., 2010). Embora a capacidade de inibir a ativação das células tenha sido reduzida, o efeito anti-inflamatório decorrente de exposição prolongada favorece o tipo de consumo esperado para nutracêuticos que não atuam como tratamento, mas como promotores de saúde a um longo prazo de consumo.

Por outro lado, a bebida fermentada de babaçu e caju também estimulou o aumento da síntese de NO em 6 e 24 horas de pré-tratamento. Este aumento pode ser explicado por dois fatores, a presença de pós-bióticos imunomoduladores e a proliferação celular. Metabólitos de probióticos como bacteriocinas, ou mesmo partículas derivadas da parede bacteriana, podem se ligar a receptores do tipo toll desencadeando uma cascata inflamatória que potencializa a produção do radical (BENÍTEZ-CHAO et al., 2021), semelhante ao que foi observado em um estudo com leite fermentado rico em pós-bióticos que demonstrou que a suplementação da cultura com o produto fermentado aumentou a expressão de citocinas relacionadas a resposta Th1 e Th17 (AYECHU-MURUZABAL et al., 2021). Além disso, nas duas menores concentrações da bebida de babaçu e caju fermentada após 24 horas de pré-tratamento, a proliferação celular observada no ensaio de citotoxicidade também pode estar relacionada ao aumento da produção de NO.

É importante salientar que o principal agente imunomodulador de alimentos fermentados é o probiótico em si. Além de seus metabólitos, a interação das BAL com as células imunes e o epitélio intestinal é mais pronunciada e bem documentada. Por se tratar de um estudo *in vitro* onde condições mais complexas de interação são escassas, o potencial imunomodulador das bebidas fermentadas pode estar limitado. Em nossos achados anteriores durante o estudo *in vivo*, os camundongos foram tratados de forma profilática, consumindo as bebidas nos 14 dias anteriores a indução da sepse. A dosagem de citocinas no soro dos animais apontou para o potencial imunomodulador das bebidas probióticas, com babaçu e buriti reduzindo significativamente a produção de agentes pró-inflamatórios como TNF- α , e babaçu e caju inibindo IL-6, IL-17 e TNF- α (DIAS, 2023). A produção de NO se encontra elevada durante a sepse, está ligada ao choque séptico, contribui para a hipotensão e resposta prejudicada a terapia, o controle da produção do radical é crucial para obter um prognóstico favorável.

CONCLUSÃO

Nas condições avaliadas, as duas bebidas mistas demonstraram potencial funcional e veículo adequado para as bactérias probióticas. A fermentação das bebidas mistas pelo probiótico *Lactobacillus casei* altera significativamente tanto componentes bioativos, quanto suas propriedades funcionais. Embora os resultados tenham mostrado diminuição do teor de compostos fenólicos e flavonoides após a fermentação, a atividade antioxidante não foi afetada significativamente para eliminação de radicais DPPH e inibição da Peroxidação Lipídica. Entretanto, não foi observada atividade antibacteriana significativa em nenhuma das formulações testadas, o que pode estar relacionado à concentração das amostras utilizadas, à matriz vegetal, ou à ausência de metabólitos com efeito antimicrobiano nas condições avaliadas. Além disso, os resultados sugerem que as bebidas não fermentadas apresentaram maior potencial imunomodulador em comparação com as fermentadas, indicando que a fermentação pode impactar de maneira complexa e nem sempre positiva as propriedades funcionais esperadas, porém mostra que com maior tempo de exposição é possível promover um perfil anti-inflamatório nos macrófagos, o que reforça o uso profilático do produto. Assim, embora as bebidas fermentadas não tenham apresentado superioridade absoluta nas três propriedades avaliadas, o estudo contribui para o entendimento dos efeitos da fermentação em matrizes vegetais regionais e abre espaço para novas abordagens na formulação de alimentos funcionais baseados em ingredientes da biodiversidade brasileira. A caracterização das bebidas mistas antes e após a fermentação por cromatografia pode elucidar a mudança do perfil químico, bem como a dosagem de citocinas podem trazer evidências mais completas sobre a interação direta entre as células e as bebidas mistas.

REFERÊNCIAS

- AKBARI, B. et al. The role of plant-derived natural antioxidants in reduction of oxidative stress. **BioFactors**, v. 48, n. 3, p. 611–633, 1 maio 2022.
- ALZOGHAIBI, M. A. Concepts of oxidative stress and antioxidant defense in Crohn's disease. **World Journal of Gastroenterology : WJG**, v. 19, n. 39, p. 6540, 21 out. 2013.
- AMBRIZ-PÉREZ, D. L. et al. Phenolic compounds: Natural alternative in inflammation treatment. A Review. **Cogent Food & Agriculture**, v. 2, n. 1, 31 dez. 2016.
- ANJANA; TIWARI, S. K. Bacteriocin-Producing Probiotic Lactic Acid Bacteria in

Controlling Dysbiosis of the Gut Microbiota. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, v. 12, p. 851140, 16 maio 2022.

AYECHU-MURUZABAL, V. et al. A Fermented Milk Matrix Containing Postbiotics Supports Th1- and Th17-Type Immunity In Vitro and Modulates the Influenza-Specific Vaccination Response In Vivo in Association with Altered Serum Galectin Ratios. **Vaccines** 2021, Vol. 9, Page 254, v. 9, n. 3, p. 254, 13 mar. 2021.

BENÍTEZ-CHAO, D. F. et al. Bacteriocins: An Overview of Antimicrobial, Toxicity, and Biosafety Assessment by in vivo Models. **Frontiers in Microbiology**, v. 12, p. 630695, 15 abr. 2021.

BOY, F. R. et al. Antioxidant, Antihypertensive and Antimicrobial Properties of Phenolic Compounds Obtained from Native Plants by Different Extraction Methods. **International journal of environmental research and public health**, v. 18, n. 5, p. 1–12, 1 mar. 2021.

CELIBERTO, L. S. et al. Effect of a probiotic beverage consumption (*Enterococcus faecium* CRL 183 and *Bifidobacterium longum* ATCC 15707) in rats with chemically induced colitis. **PLOS ONE**, v. 12, n. 4, p. e0175935, 1 abr. 2017.

CRUZ REINA, L. J. et al. Chemical composition and bioactive compounds of cashew (*Anacardium occidentale*) apple juice and bagasse from Colombian varieties. **Heliyon**, v. 8, n. 5, p. e09528, 1 maio 2022.

CSATLOS, N. et al. Development of a Fermented Beverage with *Chlorella vulgaris* Powder on Soybean-Based Fermented Beverage. **Biomolecules**, 2023.

DA SILVA, L. A. et al. Cupuassu juice fermentation by *Lactiplantibacillus plantarum* Lp62 produces an antioxidant enriched probiotic beverage. **Letters in Applied Microbiology**, v. 76, n. 3, p. 1–8, 1 mar. 2023.

DE ASSIS, B. B. et al. Biotransformation of the Brazilian Caatinga fruit-derived phenolics by *Lactobacillus acidophilus* La-5 and *Lactocaseibacillus casei* 01 impacts bioaccessibility. **Food Research International**, , 2021.

DE CARVALHO MARCHESIN, J. et al. A soy-based probiotic drink modulates the microbiota and reduces body weight gain in diet-induced obese mice. **Journal of Functional Foods**, v. 48, p. 302–313, 1 set. 2018.

DIETL, K. et al. Lactic Acid and Acidification Inhibit TNF Secretion and Glycolysis of Human Monocytes. **The Journal of Immunology**, v. 184, n. 3, p. 1200–1209, 1 fev. 2010.

DUTRA, R. P. et al. Phenolic acids, hydrolyzable tannins, and antioxidant activity of geopropolis from the stingless bee *Melipona fasciculata* Smith. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 62, n. 12, p. 2549–2557, 26 mar. 2014.

DUTRA, R. P. et al. Brazilian Amazon Red Propolis: Leishmanicidal Activity and Chemical Composition of a New Variety of Red Propolis. **Metabolites** 2023, Vol. 13, Page 1027, v. 13, n. 9, p. 1027, 21 set. 2023.

EL-DEIN, A. et al. Assessment of exopolysaccharides, bacteriocins and in vitro and in vivo hypocholesterolemic potential of some Egyptian Lactobacillus spp. **International Journal of Biological Macromolecules**, 2021.

FERREIRA, L. E. et al. Paine molecular para detecção de microrganismos associados à sepse. **Revista Brasileira de Terapia Intensiva**, v. 23, n. 1, p. 36–40, mar. 2011.

GUAN, Q.; XIONG, T.; XIE, M. Influence of Probiotic Fermented Fruit and Vegetables on Human Health and the Related Industrial Development Trend. **Engineering**, v. 7, n. 2, p. 212–218, 1 fev. 2021.

HADAD, N.; LEVY, R. The synergistic anti-inflammatory effects of lycopene, lutein, β -carotene, and carnosic acid combinations via redox-based inhibition of NF- κ B signaling. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 53, n. 7, p. 1381–1391, 1 out. 2012.

HAN, E. J. et al. Sargachromenol purified from sargassum horneri inhibits inflammatory responses via activation of nrf2/ho-1 signaling in lps-stimulated macrophages. **Marine Drugs**, v. 19, n. 9, p. 497, 1 set. 2021.

HILL, C. et al. 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 Gastroenterology and Hepatology**, v. 11, n. 8, p. 506–514, 2014a.

JEONG, C. H. et al. Enhancement of the functional properties of vegetable sponge beverage fermented with Lactobacillus plantarum isolated from Korean dongchimi. **LWT**, v. 165, p. 113721, 1 ago. 2022.

KANG, C. H. et al. Heat-Killed Lactic Acid Bacteria Inhibit Nitric Oxide Production via Inducible Nitric Oxide Synthase and Cyclooxygenase-2 in RAW 264.7 Cells. **Probiotics and Antimicrobial Proteins**, v. 13, n. 6, p. 1530, 1 dez. 2021.

KELLUM, J. A.; SONG, M.; LI, J. Lactic and hydrochloric acids induce different patterns of inflammatory response in LPS-stimulated RAW 264.7 cells. **American Journal of Physiology - Regulatory Integrative and Comparative Physiology**, v. 286, n. 4 55-4, p. 686–692, 2004.

KEMPKA, A. P. et al. Formulation of a peach-flavored dairy drink using alternative substrates and probiotic culture. **Ciencia e Tecnologia de Alimentos**, v. 28, n. SUPPL., p. 170–177, 2008.

KIM, D.; OH, I. Development of fermented beverage with citrus fruit extract using probiotics: impact on antioxidant activity and in vitro digestibility. **Applied Biological Chemistry**, v. 67, n. 1, p. 1–11, 1 dez. 2024.

LE, B.; ANH, P. T. N.; YANG, S. H. Enhancement of the Anti-Inflammatory Effect of Mustard Kimchi on RAW 264.7 Macrophages by the Lactobacillus plantarum Fermentation-Mediated Generation of Phenolic Compound Derivatives. **Foods 2020, Vol. 9, Page 181**, v. 9, n. 2, p. 181, 12 fev. 2020.

LEONARD, W. et al. Fermentation transforms the phenolic profiles and bioactivities of plant-based foods. **Biotechnology Advances**, v. 49, p. 107763, 1 jul. 2021.

LIMA, J. A. L. DE et al. *Attalea speciosa* Mart. ex Spreng (Arecaceae): Uma revisão integrativa quanto as principais características biotecnológicas / *Attalea speciosa* Mart. ex Spreng (Arecaceae): An integrative review of the main biotechnological characteristics. **Brazilian Journal of Development**, v. 6, n. 7, p. 48639–48661, 20 jul. 2020.

LIMA, M. M. A. et al. Photoprotective and antioxidant effect of babassu mesocarp flour extracts. **Acta Amazonica**, v. 53, n. 4, p. 294–301, 13 nov. 2023.

LIU, Y. et al. Beneficial Effects of Tomato Juice Fermented by *Lactobacillus Plantarum* and *Lactobacillus Casei*: Antioxidation, Antimicrobial Effect, and Volatile Profiles. **Molecules : A Journal of Synthetic Chemistry and Natural Product Chemistry**, v. 23, n. 9, p. 2366, 16 set. 2018.

LOPES, R. DE C. S. O. et al. Modulation of intestinal microbiota, control of nitrogen products and inflammation by pre/probiotics in chronic kidney disease: a systematic review. **Nutricion hospitalaria**, 2018.

MAO, Y.; ZHANG, X.; XU, Z. Identification of antibacterial substances of *Lactobacillus plantarum* DY-6 for bacteriostatic action. **Food science & nutrition**, v. 8, n. 6, p. 2854–2863, 1 jun. 2020.

MAYR, F. B.; YENDE, S.; ANGUS, D. C. Epidemiology of severe sepsis. **Virulence**, v. 5, n. 1, p. 4, 2013.

MONTEMURRO, M. et al. Plant-Based Alternatives to Yogurt: State-of-the-Art and Perspectives of New Biotechnological Challenges. **Foods (Basel, Switzerland)**, v. 10, n. 2, 1 fev. 2021.

NOH, H. J. et al. Immunostimulatory Effect of Heat-Killed Probiotics on RAW264.7 Macrophages. **Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 32, n. 5, p. 638, 1 maio 2022.

NUALKAEKUL, S.; CHARALAMPOPOULOS, D. Survival of *Lactobacillus plantarum* in model solutions and fruit juices. **International Journal of Food Microbiology**, v. 146, n. 2, p. 111–117, 30 mar. 2011.

OLIVEIRA-JÚNIOR, J. B. et al. In vitro activity of riparin III in combination with antimicrobials against multidrug-resistant clinical isolates of *Staphylococcus aureus* and *Acinetobacter baumannii*. **Phytomedicine Plus**, v. 3, n. 1, p. 100414, 1 fev. 2023.

PAPADIMITRIOU, K. et al. Discovering probiotic microorganisms: In vitro, in vivo, genetic and omics approaches. **Frontiers in Microbiology**, v. 6, n. FEB, p. 129543, 17 fev. 2015.

PEREIRA, A. L. F. et al. Storage Stability and Acceptance of Probiotic Beverage from Cashew Apple Juice. **Food and Bioprocess Technology**, v. 6, n. 11, p. 3155–3165, 1 nov. 2013.

PEREIRA, A. L. F. et al. Impact of fermentation conditions on the quality and sensory

properties of a probiotic cupuassu (*Theobroma grandiflorum*) beverage. **Food Research International**, v. 100, p. 603–611, 1 out. 2017.

PEREIRA, A. L. F.; MACIEL, T. C.; RODRIGUES, S. Probiotic beverage from cashew apple juice fermented with *Lactobacillus casei*. **Food Research International**, v. 44, n. 5, p. 1276–1283, 1 jun. 2011.

PLAZA-DÍAZ, J. et al. Evidence of the Anti-Inflammatory Effects of Probiotics and Synbiotics in Intestinal Chronic Diseases. **Nutrients** **2017, Vol. 9, Page 555**, v. 9, n. 6, p. 555, 28 maio 2017.

PLAZA-DÍAZ, J. et al. The Gut Barrier, Intestinal Microbiota, and Liver Disease: Molecular Mechanisms and Strategies to Manage. **International Journal of Molecular Sciences** **2020, Vol. 21, Page 8351**, v. 21, n. 21, p. 8351, 7 nov. 2020.

QURESHI, A. A. et al. Suppression of nitric oxide induction and pro-inflammatory cytokines by novel proteasome inhibitors in various experimental models. **Lipids in Health and Disease**, v. 10, n. 1, p. 1–25, 12 out. 2011.

ROCCHETTI, G. et al. Functional implications of bound phenolic compounds and phenolics–food interaction: A review. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, v. 21, n. 2, p. 811–842, 1 mar. 2022.

RU, Y. R. et al. The influence of probiotic fermentation on the active compounds and bioactivities of walnut flowers. **Journal of food biochemistry**, v. 46, n. 4, 1 abr. 2022.

SASI, M. et al. Current trends in the development of soy-based foods containing probiotics and paving the path for soy-synbiotics. **Critical reviews in food science and nutrition**, v. 63, n. 29, p. 9995–10013, 2023.

SINGH, B. et al. Antioxidative, ACE inhibitory and antibacterial activities of soy milk fermented by indigenous strains of lactobacilli. **Wiley Online LibraryBP Singh, B Bhushan, S VijLegume Science, 2020•Wiley Online Library**, v. 2, n. 4, 1 dez. 2020.

SINGH, S. S. et al. Physical, chemical, textural, and thermal properties of cashew apple fruit. **Journal of Food Process Engineering**, v. 42, n. 5, p. e13094, 1 ago. 2019.

SOKAL, R. et al. Biostatistics. **academia.edu**, 1987.

THODA, C.; TOURAKI, M. Immunomodulatory Properties of Probiotics and Their Derived Bioactive Compounds. **Applied Sciences** **2023, Vol. 13, Page 4726**, v. 13, n. 8, p. 4726, 9 abr. 2023.

UPADHYAY, R. et al. Antioxidant Property of Aerial Parts and Root of *Phyllanthus fraternus* Webster, an Important Medicinal Plant. **The Scientific World Journal**, v. 2014, n. 1, p. 692392, 1 jan. 2014.

VAN ZYL, W. F.; DEANE, S. M.; DICKS, L. M. T. Molecular insights into probiotic mechanisms of action employed against intestinal pathogenic bacteria. **Gut Microbes**, v. 12, n. 1, p. 1831339, 9 nov. 2020.

WANG, H. et al. Lipid peroxidation-induced ferroptosis as a therapeutic target for mitigating neuronal injury and inflammation in sepsis-associated encephalopathy: insights into the hippocampal PEBP-1/15-LOX/GPX4 pathway. **Lipids in Health and Disease**, v. 23, n. 1, p. 1–13, 1 dez. 2024.

WANG, P. et al. Kombucha ameliorates LPS-induced sepsis in a mouse model. **Food & Function**, v. 12, n. 20, p. 10263–10280, 19 out. 2021.

WANG, X. et al. Probiotics regulate gut microbiota: an effective method to improve immunity. **mdpi.com**X Wang, P Zhang, X Zhang**Molecules**, 2021.

WANG, Z. et al. From Function to Metabolome: Metabolomic Analysis Reveals the Effect of Probiotic Fermentation on the Chemical Compositions and Biological Activities of *Perilla frutescens* Leaves. **Frontiers in Nutrition**, v. 9, 11 jul. 2022.

WU, Y. et al. Fermentation of blueberry and blackberry juices using *Lactobacillus plantarum*, *Streptococcus thermophilus* and *Bifidobacterium bifidum*: Growth of probiotics. **Elsevier**Y Wu, S Li, Y Tao, D Li, Y Han, PL Show, G Wen, J Zhou**Food Chemistry**, 2021•Elsevier, 2023.

XIE, M. et al. Two separate mechanisms are involved in membrane permeabilization during lipid oxidation. **Biophysical journal**, v. 122, n. 23, p. 4503–4517, 5 dez. 2021.

ZHANG, Z. et al. Roles and applications of probiotic *Lactobacillus* strains. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 102, n. 19, p. 8135–8143, 1 out. 2018.

ZHAO, Z. et al. Evaluation of a strawberry fermented beverage with potential health benefits. **PeerJ**, v. 9, p. e11974, 23 ago. 2021.

ZHONG, H. et al. Probiotics-fermented blueberry juices as potential antidiabetic product: antioxidant, antimicrobial and antidiabetic potentials. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 101, n. 10, p. 4420–4427, 15 ago. 2021.

ANEXO I

Probiotics and Antimicrobial Proteins
<https://doi.org/10.1007/s12602-024-10426-w>

REVIEW



Antioxidant and Antimicrobial Properties of Probiotics: Insights from In Vitro Assays

Fernanda Farias Costa¹ · Tatielle Gomes Dias² · Priscila Mendonça Mendes² · Jesse Pereira Machado Viana³ · Eveline Brandão Madeira⁴ · Ana Lúcia Fernandes Pereira¹ · Adriana Gomes Nogueira Ferreira¹ · Marcelino Santos Neto¹ · Richard Pereira Dutra¹ · Aramys Silva Reis¹ · Márcia Cristina Gonçalves Maciel^{1,2,3}

Accepted: 6 December 2024

© The Author(s), under exclusive licence to Springer Science+Business Media, LLC, part of Springer Nature 2024

Abstract

Probiotics are microorganisms that provide health benefits at adequate doses and exhibit notable antioxidant and antimicrobial activities. These properties play crucial roles in combating chronic diseases linked to oxidative stress and antimicrobial resistance. This review aimed to summarize the antioxidant and antimicrobial properties of probiotics determined in in vitro studies and discuss mechanistic actions and analysis methods. The MEDLINE (PubMed), Web of Science, Scopus, Science Direct, and Embase databases were utilized. The included articles demonstrated the antioxidant and antimicrobial activities of both isolated and food matrix-associated probiotics, with the most common genera being *Lactobacillus*, *Bifidobacterium*, *Saccharomyces*, and *Streptococcus*. Antioxidant activity was the most studied property, yielding varied results attributed to evaluation tests and probiotic strain. Antibacterial activity was consistently reported in all studies. Additionally, fermentation with probiotic microorganisms improved the content and bioaccessibility of bioactive compounds. In conclusion, analysis results highlight the antioxidant and antimicrobial activity of probiotics reported in in vitro studies. They enhance bioactive content and bioaccessibility and produce novel beneficial metabolites during fermentation. These results reinforce the therapeutic promise of probiotics associated with plant matrices and indicate the need for clinical studies to confirm their efficacy in improving human health.

Keywords Nutraceuticals · Bioactives · Biotransformation · Bacteriocins · Fermented foods

Introduction

Probiotics are live strains of selected microorganisms that provide health benefits to the host in adequate quantities [1]. They are used in food fermentation to improve preservation and enhance sensory characteristics. Moreover, pharmaceutical and functional food industries have widely explored probiotics to incorporate their health benefits into consumer diets [2].

The most common probiotic genera are *Lactobacillus*, *Bifidobacterium*, *Enterococcus*, and *Saccharomyces*, owing to their safety and adaptation to the complex environment of the gastrointestinal tract [3]. Biotransformation triggered by the fermentation of substrates into which these microorganisms are inoculated can improve the bioavailability of various components, such as antioxidants, antimicrobial substances, and bioactive compounds [4].

The gastrointestinal tract is the primary active site of probiotics, where they play various roles, such as regulation of

✉ Márcia Cristina Gonçalves Maciel
marcia.maciel@unb.br

Ana Lúcia Fernandes Pereira
ana.fernandes@ufma.br

Adriana Gomes Nogueira Ferreira
adriana.nogueira@ufma.br

Marcelino Santos Neto
marcelino.santos@ufma.br

¹ Center for Sciences of Imperatriz, Graduate Program in Health and Technology, Federal University of Maranhão, Imperatriz, Maranhão, Brazil

² Graduate Program in Health Sciences, Federal University of Maranhão, São Luís, Maranhão, Brazil

³ Graduate Program in Molecular Biology, Department of Cell Biology, Institute of Biological Sciences, University of Brasília, Brasília, Distrito Federal, Brazil

⁴ Imperatriz, Maranhão, Brazil

intestinal microbiota, protection against infections, stimulation of immune responses and anti-inflammatory activity, metabolic regulation, and protection against some types of cancer [5, 6]. Prebiotics can modulate the intestinal microbiota and enhance the digestion of polysaccharides and oligosaccharides that are generally indigestible by the host. The association of probiotics and prebiotics is termed synbiotics [7].

Antibiotic resistance is a major public health problem responsible for approximately 700,000 deaths worldwide. Diarrheal infections alone accounted for 1.5 million deaths in 2019 [8, 9]. Probiotics effectively control various pathogenic infections, prevent diarrhea associated with antibiotic use, and protect against food-contaminating pathogenic microorganisms such as *Clostridium botulinum* via various mechanisms, including competition in the intestinal micro-environment, bacteriocin production, immunomodulation, and epithelial barrier stimulation [5, 10, 11].

Probiotics are also used to treat inflammatory bowel disease by significantly reducing oxidative stress caused by high concentrations of tissue-damaging free radicals [12]. The antioxidant capacity of probiotic strains is related to their ability to chelate ions, secrete enzymes and antioxidant metabolites, and regulate enzymes producing reactive oxygen species [13]. Oxidative stress is involved in the onset and progression of various types of cancer and neurodegenerative, metabolic, and cardiovascular diseases. It was the leading cause of death in 2019, indicating the necessity of developing strategies to control the stress induced by free radical accumulation in the body [8, 14–17].

Various in vivo studies and clinical trials have demonstrated the health benefits of both isolated and food matrix-associated probiotics [18]. However, their different interactions with the complex environment of the gastrointestinal tract make it difficult to elucidate the mechanistic action and properties of probiotics. The results of in vivo studies on the bioactivity of probiotics are not consistent with those of in vitro studies. Therefore, in this review, we discussed the antioxidant and antimicrobial properties of probiotics determined in various in vitro studies, highlighted their potential action mechanisms, and summarized their analysis methods.

Methods

This is an integrative literature review that aims to enhance the understanding of a specific topic. This review involved the following steps: identification of the theme and development of the guiding research question, selection and extraction of data, categorization of studies, data analysis, synthesis of results, and presentation of an integrative review [19].

To develop the guiding question, the PICO strategy, where “P”, “I”, and “Co” refer to the population (probiotics),

interest (antioxidant and antimicrobial activities), and “Co” context (in vitro studies), respectively, was used according to the Joanna Briggs Institute (JBI) guidelines. The guiding question for the integrative review was: “What are the scientific evidences of the antioxidant and antimicrobial activities of probiotics in in vitro studies?” [20].

Data was collected via a bibliographic search of the MEDLINE (PubMed), Web of Science, Scopus, Science Direct, and Embase databases using both controlled terms under Medical Subject Headings (MeSH) and the uncontrolled terms, “probiotics”, “fermented beverages”, “antimicrobial”, “bactericidal”, “inhibits growth”, “antioxidants”, “free radical”, and “in vitro”. For the MEDLINE (PubMed) database, two sets of descriptors were used, one to search for articles on antioxidant activity and the other to search for articles on antimicrobial activity, owing to the difficulty of finding articles in joint searches. The selected descriptors and Boolean operators “AND” and “OR” were used to intersect the terms in each database.

The articles identified from the search were inserted into the Rayyan platform to identify and exclude any duplicate texts and reviews [21]. Studies investigating the antioxidant and antimicrobial properties of probiotics using in vitro methods in full in any language published between 2013 and 2023 were included in this review. However, dissertations, narrative, integrative, or systematic reviews, and meta-analyses and studies characterizing new probiotic strains were excluded from this review. An adaptation of the PRISMA flowchart (Preferred Reporting Items for Systematic Reviews and Meta-Analyses) was used to describe the article selection process [22].

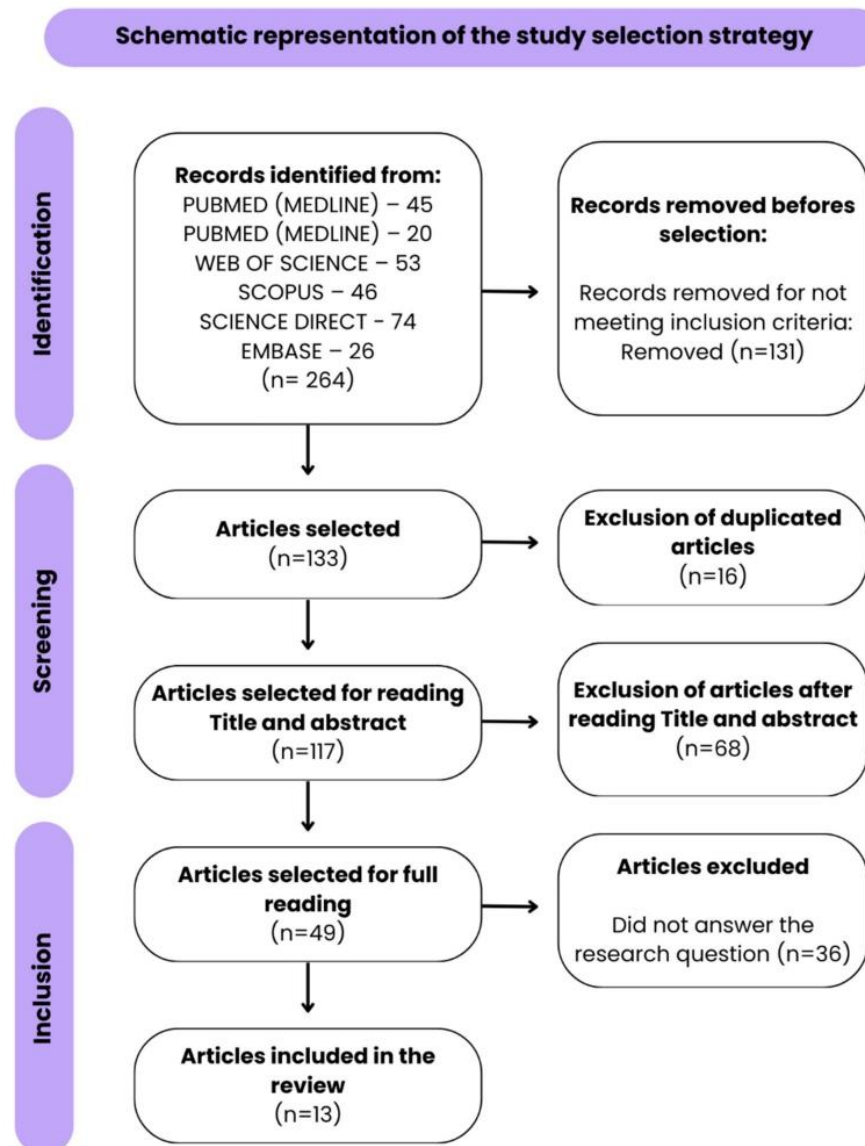
To analyze the data in the selected studies, the following information was observed: year of publication, title, objective, methods used, probiotic strain studied, association with the food matrix, results of antioxidant and antimicrobial tests, and conclusions. The extracted data was further analyzed based on the probiotic characteristics during tests to classify the information and provide an overview of the topic.

Results

A total of 264 articles that matched the cross-referencing of descriptors in the databases were identified, of which 49 were read in full. Only 13 articles addressed the research question and were finally selected for this review. The search strategy and article selection steps are illustrated in Fig. 1.

All selected articles were in English, of which 84% were published in the last 5 years. To assess the scientific evidence on the antioxidant and antimicrobial properties of probiotics, data on various characteristics, such as the probiotic strain, methods used, probiotic formulation studied, and results of

Fig. 1 Flowchart of the article selection using PRISMA
(Source: Adapted from Prisma 2020 flowchart)



antioxidant and antimicrobial activity tests, were extracted from the selected studies. Results are listed in Table 1

Discussion

Of the 13 articles included in this review, 7 studied non-dairy fermented beverages. Fermented beverages are a key category of functional food in the market owing to their convenience and suitability as vehicles for probiotics. Traditionally, probiotics have been associated with dairy compounds. However, a significant number of the articles found in the search, and all studies on probiotic

beverages included in this review, are focused on probiotics of plant origin. This finding highlights the changing trend in the development of probiotic food for lactose-intolerant individuals, vegetarians, and vegans, who do not consume any dairy products [34]. Approximately 60% of the global population has lactose digestion problems [35]. Moreover, 5% follow a vegetarian diet, with 3.7% identifying as vegans in the USA. This estimate reaches 30% in India, mainly for religious reasons. In Europe, 2% of the French population and 9% of the German population are vegetarian. This shift in the dietary habits of consumers has increased the demand for probiotic products of plant origin [36].

Table 1 Key findings in the evaluation of the properties of the studied probiotics

Probiotic strain	Methods	Formulation	Results		References
			Antioxidant activity (AOA)	Antimicrobial activity (AMA)	
<i>Lp. pentosus</i> GSSK2	FRAP, DDA	Herbal wine	AOA ↑ In relation to control	AMA of the fermented product ↑ (<i>S. aureus</i> , <i>L. monocytogenes</i> , <i>E. coli</i> , <i>P. mirabilis</i> , <i>K. pneumoniae</i>)	[23]
<i>S. boulardii</i>	DPPH, OCM	CFS	Probiotic = DPPH (67.0 ± 0.13%) Supernatant ↑ DPPH (69.8 ± 0.08%)	AMA Metabolites of <i>S. boulardii</i> ↑ (<i>E. coli</i> , inhibition zone of 15.43 ± 0.26 mm)	[24]
<i>Lp. plantarum</i> , <i>S. thermophilus</i> , and <i>B. bifidum</i>	ABTS and FRAP	Blueberry and blackberry juices	AOA of the fermented product ↑ (ABTS) Varied depending on the strain used in fermentation	There was no investigation of antimicrobial activity in this study	[25]
<i>Lc. paracasei</i> , <i>L. bulgaricus</i> , <i>Li. fermentum</i> , and <i>Lp. plantarum</i>	DPPH, DDA, MIC	CFS	AOA ↑ (dependent on the concentration) <i>L. bulgaricus</i> ↑ in DPPH at all concentrations	AMA CFS ↑ (<i>C. botulinum</i> type E with inhibition zones ranging from 32 ± 1.15e 36 ± 0.57 mm, or no activity, depending on the strain)	[11]
<i>L. acidophilus</i> LA-05 and <i>Lc. casei</i> 01	ORAC	Puree of Seriguela, Mangaba, Pink Mango, and Acerola fruits	AOA of the fermented fruit purees ↑ ↑ phenolics and bioavailability	There was no investigation of antimicrobial activity in this study	[4]
<i>Lp. plantarum</i> NMP4765, 768, 763, <i>Lc. rhamnosus</i> NMP4762, 7628, 7634	DPPH, DDA	CFS and exopolysaccharides	AOA CFS ↑ (93–100%) AAO Exopolysaccharides (79–96%)	AMA Bacteriocins ↑ (Gram + and Gram –) and yeasts, with variations among strains	[26]
<i>B. animalis</i> ssp. <i>lactis</i> Bb12 <i>Lc. rhamnosus</i> R11	ABTS	Okara beverage	AOA of the fermented product ↓ AOA of the non-fermented product ↑	There was no investigation of antimicrobial activity in this study	[27]
<i>Fu. rossiae</i> , <i>Li. reuteri</i> , <i>Lp. plantarum</i> 12A and PU1, <i>Lc. rhamnosus</i> , <i>Lc. casei</i> , <i>Lc. paracasei</i> , <i>B. breve</i> , and <i>B. animalis</i>	ABTS, LAA	Grape pomace as a substrate for the growth and fermentation of probiotic strains	AOA em ABTS = AOA em LAA ↑ (especially <i>Lp. plantarum</i> PU1)	There was no investigation of antimicrobial activity in this study	[28]
<i>Lp. plantarum</i> X7021 X7022 and <i>Li. fermentum</i> S1L23	DPPH, CAA, OCM	Black garlic as a substrate for the growth and fermentation of the strains	AOA of the fermented product ↓ (DPPH) AOA of the fermented product ↑ (CAA)	AMA of the fermented product ↑ (<i>H. pylori</i> – 26.5 mm inhibition zone) AMA of the non-fermented product ↓ (10 mm)	[29]

Table 1 (continued)

Probiotic strain	Methods	Formulation	Results		References
			Antioxidant activity (AOA)	Antimicrobial activity (AMA)	
<i>S. thermophilus</i> , <i>S. intestinalis</i> , and <i>S. cerevisiae</i>	DPPH, ABTS, FRAP, HORAC and SRSA	Fermented apple and cantaloupe beverages	AOA in DPPH, ABTS, SRSA, and FRAP ↑ AOA in HORAC ↓ (after SDGS) AAO using DPPH and FRAP ↓ ABTS, HORAC, and SRSA ↑ (after SIDS)	There was no investigation of antimicrobial activity in this study	[30]
<i>Lp. plantarum</i> C6, <i>Lc. rhamnosus</i> C8, C25, C28, and C34, and <i>L. helveticus</i> (NCDC 288)	ABTS, DPPH, HORAC, DDA	Fermented soy milk	AOA of the fermented product ↑ (ABTS 63–70%). AOA of the fermented product ↑ (<i>Lc. rhamnosus</i> C25 and C28-DPPH) AOA of the fermented product ↓ (C8, NCDC 288, and C34 and C6) AOA of the fermented product ↑ (HORAC-All strains)	AMA of the fermented product ↑ (<i>Lp. plantarum</i> C6 against <i>E. coli</i>) AMA of the fermented product = (<i>Lp. plantarum</i> C8 and <i>Lc. rhamnosus</i> C28 against <i>S. dysenteriae</i> , <i>B. cereus</i> , <i>S. enterica</i> , <i>S. aureus</i> and <i>E. coli</i>) AMA of the fermented product ↑ (<i>Lc. rhamnosus</i> C34 and NCDC 288 only against <i>S. aureus</i> .)	[31]
<i>Lp. plantarum</i> and <i>Lc. casei</i>	ABTS, DPPH, FRAP, DDA	Fermented tomato juice	AOA of the fermented product ↑ (20.48% to 27.02% for <i>Lc. casei</i> and 20.48% to 28.57% for <i>Lp. plantarum</i>)	Both probiotics inhibited bacterial growth	[32]
<i>Lp. plantarum</i> , <i>L. bulgaricus</i> , and <i>S. cerevisiae</i>	ABTS, DPPH, HORAC, SRSA, T-AOC, OCM, GCT, MIC, and MBC	Fermented strawberry beverage	AOA of the fermented product ↓ AOA of the non-fermented product ↑ (DPPH and ABTS) AOA of the fermented product ↑ (HORAC, SRSA, and T-AOC)	AMA of the fermented product ↑ (<i>E. coli</i> – 28.30 mm—and <i>S. aureus</i> – 26.60 mm) The MIC for <i>E. coli</i> with the fermented beverage was 0.05 mL/mL and for <i>S. aureus</i> it was 0.025 mL/mL, and MBC was 0.2 mL/mL for both bacteria	[33]

FRAP ferric reducing antioxidant power, DDA agar diffusion assay, ↑ increase, OCM Oxford cup method, CFS cell-free supernatant; = no change, MIC minimum inhibitory concentration, ORAC oxygen radical absorbance capacity, ↓ decrease, LAA linoleic acid autooxidation, CAA cellular antioxidant activity, HORAC hydroxyl radical antioxidant capacity, SRSA superoxide radical scavenging activity assay, SGSD simulated gastric stage digestion, SIDS simulated intestinal stage digestion, T-AOC total antioxidant capacity, GCT Growth Curve Test, MBC minimum bactericidal concentration.

In addition to probiotic beverages, studies on fruit purees [4], grape pomace [28], and black garlic [29], both of which are used as substrates for fermentation, were included. In all three studies, the food matrix for fermentation was selected for its high concentration of bioactive compounds in its unfermented form and was assessed for growth viability. Individually, grape pomace was evaluated for viability as a substrate for fermentation because it is a by-product of the food and beverage industry, which allows for better utilization of the fruit. Meanwhile, black garlic and fruit purees benefit from the improvement of bioactive compounds through fermentation. The fermentation process of the food matrix by probiotics can improve certain characteristics of food, such as bioavailability, bioactivity, and sensory characteristics; enable the use of by-products from

the food industry, and improve storage and preservation conditions [37].

Plant-based fermented beverages and foods can add to the benefits of probiotic consumption and the inherent properties of fruits or grains used in fermentation [38]. Secondary metabolites of plant species include phenolic acids and flavonoids, which have antioxidant and antimicrobial activities, and carbohydrates with prebiotic characteristics [39]. Changes in these compounds occurred during substrate fermentation. Biotransformation is associated with the growth of fermenting microorganisms [40]. Figure 2 shows a schematic of the impact of biotransformation on the bioactive compounds produced by probiotic metabolism.

An association between probiotics and food matrix (fermented beverages, fruit puree, grape pomace, and black

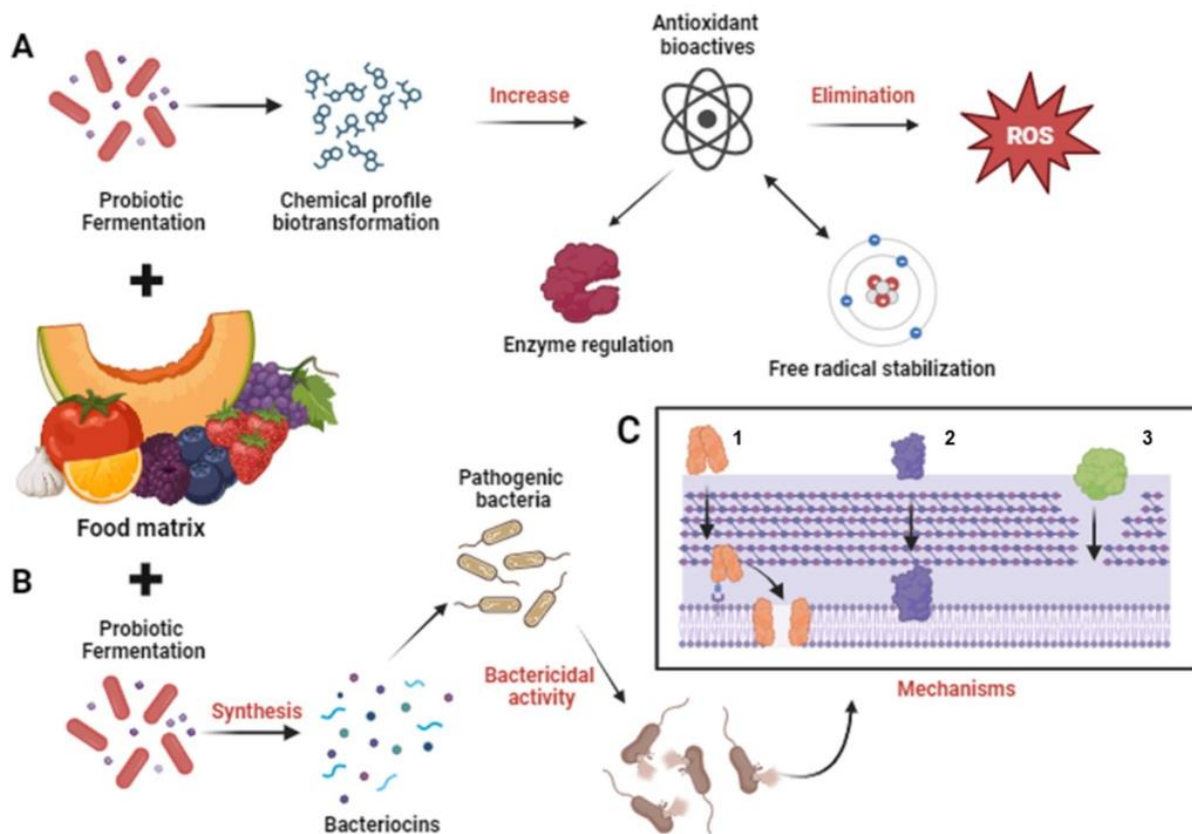


Fig. 2 Impact of Fermentation on the Antioxidant and Antimicrobial Activities of Probiotic in Fermented Beverages and Food. The association of probiotics with the food matrix improves the chemical profile, bioactive compound (A) content, and antioxidant activity of the food. Fermentation changes the phenolic profile of fermented beverages and food, releasing the bioactive compounds from larger polysaccharides or via enzymatic conversion into molecules with better bioaccessibility and greater capacity to eliminate the reactive oxygen species (ROS). Additionally, some bioactive compounds regulate the enzymes by protecting against free radicals and interfering with sign-

aling pathways. The food matrix also provides a suitable substrate for probiotic growth and metabolism, favoring the production of antimicrobial bioactive compounds such as bacteriocins (B) and bioactive peptides with bactericidal activity. These peptides vary in size and molecular weight. Various mechanisms are involved in their activity, such as the ability (C) to bind to the bacterial cell membrane via compatible receptors and form pores (1), destabilize the membrane owing to their ionic charge (2), and destroy the peptidoglycan cell wall (3)

garlic) was observed in 10 of the 13 included articles. Seven articles reported alterations in the phenolic compound composition [4, 23, 25, 27, 28, 32, 33]. Of these, four reported an increase in total phenolics [4, 23, 25, 27, 32], and two [28, 33] described a maintenance or significant decrease in total phenolic compounds. However, it is important to emphasize that the fermentation period of the strawberry beverage was six months [33]. The other evaluated compounds were flavonoids [4, 33], isoflavones [27], total carotenoids [32], and organic acids [4]. In their study evaluating the biotransformation of phenolic acids and flavonoids from *Perilla frutescens*, Wang et al. [41] demonstrated an increase in compounds in the first three days of fermentation and variation in performance between strains. This result was similar to that of another study on walnut flowers, corroborating the findings of the included articles [42].

Meanwhile, three articles studied probiotics in isolation, and all were evaluated for antioxidant and antimicrobial activities. For the evaluation of antioxidant activity, active cells of the microorganisms [24, 26], cell-free supernatants [11, 24, 26], and exopolysaccharides produced by the probiotics and isolates [26] were used. The cell-free supernatant showed the best antioxidant capacity in all three studies, and metabolomic analyses by Fu et al. [24] and Hamad et al. [11] indicated the presence of phenolic compounds, which may be related to the observed antioxidant activity. Antimicrobial activity was reported to be significant in all three articles, either for the extract containing the probiotic metabolites [24], pure cell-free supernatant [11], or isolated bacteriocins. In general, the cell-free supernatant of probiotic cultures contains metabolites that justify these properties, such as bioactive peptides, amino acids, exopolysaccharides, fatty acids, and bacteriocins produced by the strains during the fermentation process [43].

The most common genus in the included studies was *Lactobacillus* (84.6%), followed by *Bifidobacterium* and *Saccharomyces* (23% each) and *Streptococcus* (15.3%). These results are consistent with the fact that lactic acid-fermenting bacteria are the main genera used as probiotics, as they present several interesting attributes to the food industry [44], such as improving the preservation of fermented foods, enhancing the sensory and nutritional characteristics of the inoculated food matrix, and improving antimicrobial, immunomodulatory, and anticarcinogenic activities [45, 46]. In addition, the included studies with more than one probiotic strain compared the performance of the strains in terms of the properties studied, and differences in the results were found. The antioxidant activity reported by Singh et al. [31] varied according to the strain, as did the anti-clostridial activity reported by Hamad et al. [11], which ranged from the maximum inhibition zone (*Lactobacillus bulgaricus* EMCC 1102 and *Lacticaseibacillus paracasei* EMCC 1103) to no inhibition zone (*Lactiplantibacillus plantarum* EMCC

1027). Scillato et al. [47] reported that *Lactobacillus gasseri* 1A-TV inhibits the growth of *Streptococcus agalactiae*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, and *Staphylococcus aureus*, whereas no such effect was observed in the supernatant of *L. crispatus* 35A-TV, indicating a difference in the metabolic activity of the two strains.

All 13 articles evaluated the antioxidant activity of probiotics. Antioxidant activity showed the greatest variation, with some aspects affecting the results. In four of the articles [4, 23, 25, 32], the antioxidant activity was superior in probiotic fermentation compared to that in the non-fermented control. This may be related to the improvement in the phenolic profile during fermentation, as reported in all studies in which there was greater antioxidant activity. Probiotics were associated with plant-based food matrices in all studies, and the antioxidant profiles improved. Probiotic enzymes, such as α -galactosidase, β -galactosidase, and β -glucosidase, participate in the conversion processes of secondary metabolites of the fermentation substrate, as shown by Braga et al. [48] where juçara anthocyanins were converted into phenolics after fermentation, improving their antioxidant activity. In addition, probiotic fermentation produces other bioactive metabolites that participate in free radical-scavenging processes [49]. In parallel, probiotic fermentation caused a decrease in both the phenolic compound content and antioxidant activity in the study by Voss et al. [27].

Studies have shown that several factors determine the results of antioxidant activity tests. The simulated digestion process in the study by Tang et al. [30] influenced the results according to the digestion phase. This test was used to evaluate the beverage. Different probiotic strains evaluated by Singh et al. [31] presented fermentations in varying antioxidant activities. Further, the potential for free radical scavenging varied for the same probiotic fermentation according to the assay used for evaluation [28–31, 33]. The wide and varied range of bioactive compounds with distinct compositions and chemical structures may be related to the variation in the results for the same probiotic fermentation in different antioxidant activity assays, such as the positive correlation of 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) radical scavenging for phenolic compounds with 2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) (ABTS) radical scavenging for anthocyanins, and the metabolism of the different probiotic strains used for fermentation [50, 51].

Antimicrobial activity was investigated in 8 of the 13 selected articles. All the evaluated probiotic fermentations showed the ability to inhibit the growth of pathogenic bacteria [11, 23, 24, 26, 29, 31–33]. Similar results were reported in research on potential probiotic strains of the genera *Bifidobacterium* and *Lactobacillus* which showed anti-clostridial activity [52]. Vanajakshi et al. [53] also observed the antibacterial activity of moringa leaf-based probiotic fermented beverages against *Escherichia coli* and *Staphylococcus*

aureus. The metabolic processes of probiotic growth can generate various compounds with antimicrobial properties, such as organic acids, fungicidal peptides, phenols, flavonoids, and bacteriocins (Fig. 2B) [54]. Evaluation of the antimicrobial capacity of probiotics using in vitro studies is important as it brings new perspectives on the probiotic metabolites synthesized using this activity. When part of the microbiota, in addition to these metabolites, probiotics have characteristics of a more complex nature and are dependent on other mechanisms, such as better adhesion to the intestinal mucosa and competition with pathogenic bacteria, in addition to their immunomodulatory properties [55].

Some studies have reported the absence of a specific methodology for evaluating the antioxidant activity of probiotic ferments [31, 33], justifying the use of different methods in these tests. The DPPH radical elimination assay (61.5%) was the most used method, followed by ABTS (53.8%), ferric reducing ability of plasma (FRAP) (30.7%), hydroxyl radical elimination (23%), superoxide anion reduction (15.3%), oxygen radical absorbance capacity (ORAC), total antioxidant capacity (T-AOC), and cellular antioxidant capacity and linoleic acid auto-oxidation assays (7.6% each). This trend was also observed in the systematic review of Mishra et al. [56]. Meanwhile, the antibacterial activity of probiotics was evaluated using the agar diffusion assay in four studies [11, 23, 26, 31]. The Oxford Cup method, a variation of agar diffusion, was used in three studies [24, 29, 33]. The minimum inhibitory concentration (MIC) assay was performed in two studies [11, 33], and the minimum bactericidal concentration (MBC), growth curve assay [33], and adapted agar dilution in one study each [32]. Similar to antioxidant activity, antimicrobial testing of probiotics is not standardized.

Bioaccessibility, which is the capacity of nutrients to be released in the gastrointestinal tract and absorbed by the body, also undergoes changes after probiotic fermentation [57]. As reported earlier, fermentation alters the concentration of bioactive substances, such as phenols and flavonoids [58]. However, an increase in the concentration of these compounds does not necessarily guarantee that they will be absorbed more by the body. In general, the absorption of phenolics in the human body is low and factors such as degradation, food matrix, enzymatic activity, molecular structure, and aggregation with other molecules can interfere with their bioaccessibility [59]. Probiotic fermentation of plant-based matrices can increase the bioavailability of antioxidant components, as demonstrated in Fig. 2A, by releasing phenolics from the cell wall and biotransforming long chains into smaller chains, mainly through fermentation by microorganisms with high hydrolase activity. Wu et al. [25] and Assis et al. [4] found that biotransformation improved bioaccessibility by increasing the content of phenolic compounds. Voss et al. [27] observed a decrease in isoflavone glycosides after fermentation; however, isoflavone aglycones

increased. This observation indicates an improvement in the bioavailability of this component, as aglycones are better absorbed in the body than glycosides [60].

Concentrations of hydrophobic peptides in fermented okara beverage increased during simulated digestion [27]. These peptides exhibit high biological activities, including antihypertensive and antioxidant activities, and inhibit the angiotensin-converting enzyme [61]. Tang et al. [30] also reported an improved antioxidant activity during simulated gastric digestion, similar to the observation of Cele et al. [62] on the bioavailability of total phenolic compounds in fermented mango juice. Ro et al. [29] reported that the antioxidant activity measured using DPPH radical-scavenging assays and the concentration of phenolic compounds decreased considerably after fermentation. Fermented black garlic exhibited superior antioxidant activity, possibly due to the presence of bioactive compounds whose antioxidant activity was dependent on other mechanisms related to the cellular microenvironment [63].

Here, the inclusion of studies on the antioxidant and antimicrobial properties of probiotics, either isolated or associated with the food matrix, provided an overview of the behaviors of these microorganisms. The benefits of consuming probiotics are well-established [64]. However, whether inoculation into the food matrix, such as vegetables or dairy products, improves the efficacy of probiotics more than traditional pharmaceutical supplementation remains unclear [65]. This review explored the symbiotic associations between studies on isolated probiotics, focusing on the evaluation of probiotic characteristics, bioactive metabolites, exopolysaccharides, and bacteriocins via in vitro assays, and those on probiotics associated with the food matrix, from the survival of the inoculated microorganisms to the improvement of plant phytochemical content via fermentation. The association of probiotics with the food matrix improved the preservation, sensory characteristics, and stability of the fermented components in the included studies, and facilitated biotransformation to improve the bioaccessibility and phenolic contents and bioactive compounds in food.

Conclusion

This review highlights the beneficial antioxidant and antimicrobial activities of both isolated probiotics and those associated with fermented foods or beverages that promote human health. Different probiotic strains and fermentation of plant matrices increase bioactive compounds, such as phenolics, antimicrobial peptides, and organic acids. Isolated microorganisms demonstrate high bioactivity due to microbial metabolites, such as exopolysaccharides and bacteriocins, in addition to the cumulative effects of compounds in the supernatant. Although antioxidant activity varied, it

generally improved after fermentation, with some variables associated with the tests, strain, and food matrix used. In contrast, antimicrobial activity improved in all studied cases. Furthermore, in most studies on probiotic beverages and food, the bioavailability of compounds in the food matrix improved after fermentation, with biotransformation being the main factor involved. Results of the analysis revealed the diversity of methods used in different in vitro studies, suggesting the need for standardized tests for probiotic investigation. This evidence underscores the potential of probiotics associated with food matrices as promising alternatives to pharmacological supplementation. However, the findings also indicate the need for further clinical research to conclusively establish the superiority of probiotic-containing fermented foods over conventional supplements, thus providing robust evidence of their therapeutic efficacy and potential in promoting health and combating disease.

Author Contribution FFC wrote the main text of the manuscript, TGD contributed to the methodology. TGD, PMM, JPMV, and EBM assisted in the review, organization of data in the table. ALFP, AGNF, MSN, and RPD reviewed the data and corrected the methodology and results and contributed to the data in the table. ASR and MCGM contributed to the construction of the figure and reviewed and corrected the text of the entire manuscript multiple times. All authors reviewed the manuscript.

Funding This research was financially supported by Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior—Brazil (CAPES)—Finance Code 001, Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) and Fundação de Amparo à Pesquisa e ao Desenvolvimento Científico e Tecnológico do Maranhão (FAPEMA).

Declarations

Competing Interests The authors declare no competing interests.

References

- Hill C, Guarner F, Reid G, Gibson GR, Merenstein DJ, Pot B et al (2014) Expert consensus document: the international scientific association for probiotics and prebiotics consensus statement on the scope and appropriate use of the term probiotic. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* 11(8):506–514
- Prado F, Parada J, Pandey A (2008) Trends in non-dairy probiotic beverages. *Food Res Int* 41(2):111–123. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2007.10.010>
- Plaza-Díaz J, Solís-Urra P, Rodríguez-Rodríguez F, Olivares-Arancibia J, Navarro-Oliveros M, Abadía-Molina F et al (2020) The gut barrier, intestinal microbiota, and liver disease: molecular mechanisms and strategies to manage. *Int J Mol Sci* 21(21):8351. <https://doi.org/10.3390/ijms21218351>
- Assis BBT, Pimentel TC, Dantas AM, Lima MS, Borges GSC, Magnani M (2021) Biotransformation of the Brazilian Caatinga fruit-derived phenolics by *Lactobacillus acidophilus* La-5 and *Lactocaseibacillus casei* 01 impacts bioaccessibility and antioxidant activity. *Food Res Int* 146:110435. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2021.110435>
- Wang X, Zhang P, Molecules XZ (2021) Probiotics regulate gut microbiota: an effective method to improve immunity. *Molecules* 26(19):6076. <https://doi.org/10.3390/molecules26196076>
- Akram N, Faisal Z, Irfan R, Shah YA, Batool SA, Zahid T et al (2024) Exploring the serotonin-probiotics-gut health axis: a review of current evidence and potential mechanisms. *Food Sci Nutr* 12(2):694–706. <https://doi.org/10.1002/fsn3.3826>
- Dias TG, Rodrigues LS, Farias JR, Pereira ALF, Ferreira AGN, Neto MS et al (2023) Immunomodulatory activity of probiotics in models of bacterial infections. *Probiotics Antimicrob Proteins*. 1–13. <https://doi.org/10.1007/s12602-023-10090-6>
- Huemer M, MairpadyShambat S, Brugger SD, Zinkernagel AS (2020) Antibiotic resistance and persistence - implications for human health and treatment perspectives. *EMBO Rep* 21(12):e51034. <https://doi.org/10.15252/embr.202051034>
- World Health Organization (2020) The top 10 causes of death. Available from: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/the-top-10-causes-of-death>. Accessed 26 June 2023
- Guo Q, Goldenberg JZ, Humphrey C, El Dib R, Johnston BC (2019) Probiotics for the prevention of pediatric antibiotic-associated diarrhea. *CDSR n. 4*. <https://doi.org/10.1002/14651858.CD004827.pub5>
- Hamad G, Ombarak RA, Eskander M, Mehany T, Anees FR, Elfayoumy RA et al (2022) Detection and inhibition of *Clostridium botulinum* in some Egyptian fish products by probiotics cell-free supernatants as bio-preservation agents. *Lwt* 163:113603. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2022.113603>
- Ballini A, Santacroce L, Cantore S, Bottalico L, Dipalma G, Topi S et al (2019) Probiotics Efficacy on Oxidative Stress Values in Inflammatory Bowel Disease: A Randomized Double-Blinded Placebo-Controlled Pilot Study. *Endocr Metab Immune Disord Drug Targets* 19(3):373–381. <https://doi.org/10.2174/187530319666181221150352>
- Erginel B, Aydin FA, Erginel T, Tanik C, Abbasoglu SD, Soysal FG et al (2016) antioxidant effects of probiotics in experimentally induced peritonitis. *Surg Infect (Larchmt)* 17(1):114–8. <https://doi.org/10.1089/sur.2015.072>
- Kudryavtseva AV, Krasnov GS, Dmitriev AA, Alekseev BY, Kardymon OL, Sadritdinova AF et al (2016) Mitochondrial dysfunction and oxidative stress in aging and cancer. *Oncotarget* 7(29):44879. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.9821>
- Senoner T, Dichtl W (2019) Oxidative stress in cardiovascular diseases: still a therapeutic target? *Nutrients* 11(9):2090. <https://doi.org/10.3390/nu11092090>
- Teleanu DM, Niculescu AG, Lungu II, Radu CI, Vladăncenco O, Roza E et al (2022) An Overview of oxidative stress, neuroinflammation, and neurodegenerative diseases. *Int J Mol Sci* 23(11):5938. <https://doi.org/10.3390/ijms23115938>
- Ahmad MF, Alsayegh AA, Ahmad FA, Akhtar MS, Alavudeen SS, Bantun F et al (2024) *Ganoderma lucidum*: Insight into antimicrobial and antioxidant properties with development of secondary metabolites. *Heliyon* 10(3):E25607. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2024.e25607>
- Vera-Santander VE, Hernández-Figueroa RH, Jiménez-Munguía MT, Mani-López E, López-Malo A (2023) Health benefits of consuming foods with bacterial probiotics, postbiotics, and their metabolites: a review. *Molecules* 28(3):1230. <https://doi.org/10.3390/molecules28031230>
- Whittemore R, Knafl K (2005) The integrative review: updated methodology. *J Adv Nurs* 52(5):546–553. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2648.2005.03621.x>
- Lockwood C, Munn Z, Porritt K (2015) Qualitative research synthesis: methodological guidance for systematic reviewers utilizing meta-aggregation. *JBHI Evidence Implementation* 13(3):179–187. <https://doi.org/10.1097/XEB.0000000000000062>

21. Ouzzani M, Hammady H, Fedorowicz Z, Elmagarmid A (2016) Rayyan-a web and mobile app for systematic reviews. *Syst Ver* 5:5(1). <https://doi.org/10.1186/s13643-016-0384-4>
22. Page MJ, McKenzie JE, Bossuyt PM, Boutron I, Hoffmann TC, Mulrow CD et al (2021) The PRISMA 2020 statement: an updated guideline for reporting systematic reviews. *Bmj*, 372(71). <https://doi.org/10.1136/bmj.n71>
23. Kamboj S, Soni SK, Shukla G (2023) Preparation, characterization, and safety assessment of statistical optimized probiotic supplemented herbal wine from *Tinospora cordifolia*. *3 Biotech* 11:13(4). <https://doi.org/10.1007/s13205-023-03501-6>
24. Fu JJ, Liu J, Wen XP, Zhang G, Cai J, Qiao Z et al (2023) unique probiotic properties and bioactive metabolites of *Saccharomyces boulardii*. *Probiotics Antimicrob Proteins* 1;15(4):967–82. <https://doi.org/10.1007/s12602-022-09953-1>
25. Wu Y, Li S, Tao Y, Li D, Han Y, Show PL et al (2021) Fermentation of blueberry and blackberry juices using *Lactobacillus plantarum*, *Streptococcus thermophilus* and *Bifidobacterium bifidum*: Growth of probiotics, metabolism of phenolics, antioxidant capacity in vitro and sensory evaluation. *Food Chem* 348:129083. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2021.129083>
26. El-Dein AN, El-Deen AMN, El-Shatoury EH, Awad GA, Ibrahim MK, Awad HM et al (2021) Assessment of exopolysaccharides, bacteriocins and in vitro and in vivo hypocholesterolemic potential of some Egyptian *Lactobacillus* spp. *Int J Biol Macromol* 173:66–78. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2021.01.107>
27. Voss GB, Monteiro MJP, Jauregi P, Valente LM, Pintado ME (2021) Functional characterisation and sensory evaluation of a novel synbiotic okara beverage. *Food Chem* 340:127793. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2020.127793>
28. Campanella D, Rizzello CG, Fasciano C, Gambacorta G, Pinto D, Marzani B et al (2017) Exploitation of grape marc as functional substrate for lactic acid bacteria and bifidobacteria growth and enhanced antioxidant activity. *Food microbiol* 65:25–35. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2017.01.019>
29. Ro K, Chen Y, Du L, Wang L, Zhao L, Xie J et al (2022) Improvement of S-allyl-L-cysteine content, probiotic properties and constipation prevention effect of black garlic by the lactic acid bacteria fermentation. *Process Biochem* 115:110–117. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2022.02.009>
30. Tang Z, Wang Q, Zhao Z, Shen N, Qin Y, Lin W et al (2023) Evaluation of fermentation properties, antioxidant capacity in vitro and in vivo, and metabolic profile of a fermented beverage made from apple and cantaloupe. *LWT* 179:114661. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2023.114661>
31. Singh B, Bhushan B, Science SVL (2020) Antioxidative, ACE inhibitory and antibacterial activities of soy milk fermented by indigenous strains of lactobacilli. *Legume Science* 2(4):e54. <https://doi.org/10.1002/leg.3.54>
32. Liu Y, Chen H, Chen W, Zhong Q, Zhang G, Molecules WC (2018) Beneficial effects of tomato juice fermented by *Lactobacillus plantarum* and *Lactobacillus casei*: antioxidation, antimicrobial effect, and volatile profiles. *Molecules* 23(9):2366. <https://doi.org/10.3390/molecules23092366>
33. Zhao Z, Wu X, Chen H, Liu Y, Xiao Y, Chen H et al (2021) Evaluation of a strawberry fermented beverage with potential health benefits. *PeerJ* 9:e11974. <https://doi.org/10.7717/peerj.11974>
34. Csatlos NI, Simon E, Teleky BE, Szabo K, Diaconeasa ZM, Vodnar DC et al (2023) Development of a fermented beverage with *Chlorella vulgaris* powder on soybean-based fermented beverage. *Biomolecules* 13(2):245. <https://doi.org/10.3390/biom13020245>
35. Oak SJ, Jha R (2019) The effects of probiotics in lactose intolerance: a systematic review. *Crit Rev Food Sci Nutr* 59(11):1675–1683. <https://doi.org/10.1080/10408398.2018.1425977>
36. Lemale J, Mas E, Jung C, Bellaiche M, Tounian P, Hepatology FSP et al (2019) Vegan diet in children and adolescents Recommendations from the French-speaking Pediatric Hepatology, Gastroenterology and Nutrition Group (GFHGNP). *Archives de pédiatrie* 26(7):442–450. <https://doi.org/10.1016/j.arcped.2019.09.001>
37. Han J, Ye T, Liu Y-H, Chen X, Miao GP (2021) Effects of food matrix and probiotics on the bioavailability of curcumin in different nanoformulations. *J Sci Food Agric* 101(13):5627–5635. <https://doi.org/10.1002/jsfa.11215>
38. Dahiya D, Nigam PS (2022) Nutrition and health through the use of probiotic strains in fermentation to produce non-dairy functional beverage products supporting gut microbiota. *Foods* 11(18):2760. <https://doi.org/10.3390/foods11182760>
39. Szabo K, Mitrea L, Călinoiu LF, Teleky BE, Martău GA, Plamad D et al (2022) Natural polyphenol recovery from apple-, cereal-, and tomato-processing by-products and related health-promoting properties. *Molecules* 27(22):7977. <https://doi.org/10.3390/molecules27227977>
40. Niccolai A, Bažec K, Rodolfi L, Biondi N, Zlatić E, Jamnik P et al (2020) Lactic acid fermentation of *Arthrospira platensis* (Spirulina) in a vegetal soybean drink for developing new functional lactose-free beverages. *Front Microbiol* 11:560684. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.560684>
41. Wang Z, Jin X, Zhang X, Xie X, Tu Z, He X (2022) from function to metabolome: metabolomic analysis reveals the effect of probiotic fermentation on the chemical compositions and biological activities of *Perilla frutescens* leaves. *Front Nutr* 9:933193. <https://doi.org/10.3389/fnut.2022.933193>
42. Ru YR, Wang ZX, Li YJ, Kan H, Kong KW, Zhang XC (2022) The influence of probiotic fermentation on the active compounds and bioactivities of walnut flowers. *J Food Biochem* 46(4):e13887. <https://doi.org/10.1111/jfbc.13887>
43. Mai TT, Tran DQ, Roos S, Rhoads JM, Liu Y (2019) Human breast milk promotes the secretion of potentially beneficial metabolites by probiotic *Lactobacillus reuteri* DSM 17938. *Nutrients* 11(7):1548. <https://doi.org/10.3390/nu11071548>
44. Touret T, Oliveira M, Semedo-Lemsaddek T (2018) Putative probiotic lactic acid bacteria isolated from sauerkraut fermentations. *PLoS ONE* 13(9):e0203501. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0203501>
45. Reuben RC, Roy PC, Sarkar SL, Alam ARU, Jahid IK (2020) Characterization and evaluation of lactic acid bacteria from indigenous raw milk for potential probiotic properties. *JDS* 103(2):1223–1237. <https://doi.org/10.3168/jds.2019-17092>
46. Kapse N, Pisu V, Dhakephalkar T, Margale P, Shetty D, Wagh S et al (2024) unveiling the probiotic potential of *Streptococcus thermophilus* MCC0200: insights from in vitro studies corroborated with genome analysis. *Microorganisms* 12(2):347. <https://doi.org/10.3390/microorganisms12020347>
47. Scillato M, Spitale A, Mongelli G, Privitera GF, Mangano K, Cianci A et al (2021) Antimicrobial properties of *Lactobacillus* cell-free supernatants against multidrug-resistant urogenital pathogens. *Microbiologyopen* 10(2):e1173. <https://doi.org/10.1002/mbo3.1173>
48. Braga ARC, Mesquita LMS, Martins PLG, Habu S, Rosso VV (2018) *Lactobacillus* fermentation of jussara pulp leads to the enzymatic conversion of anthocyanins increasing antioxidant activity. *J Food Compos Anal* 69:162–170. <https://doi.org/10.1016/j.jfca.2017.12.030>
49. Zhong H, Abdullah ZM, Tang J, Deng L, Feng F (2021) Probiotics-fermented blueberry juices as potential antidiabetic product: antioxidant, antimicrobial and antidiabetic potentials. *J Sci Food* 101(10):4420–4427. <https://doi.org/10.1002/jsfa.11083>
50. Kwaw E, Ma Y, Tchabo W, Apaliya MT, Wu M, Sackey AS et al (2018) Effect of *Lactobacillus* strains on phenolic profile, color attributes and antioxidant activities of lactic-acid-fermented mulberry juice. *Food Chem* 250:148–154. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2018.01.009>

51. Bai L, Xu D, Zhou YM, Zhang YB, Zhang H, Chen YB et al (2022) Antioxidant activities of natural polysaccharides and their derivatives for biomedical and medicinal applications. *Antioxidants* 11(12):2491. <https://doi.org/10.3390/antiox11122491>
52. Monteiro CR, Carmo MS, Melo BO, Alves MS, Santos CI, Monteiro SG et al (2019) In vitro antimicrobial activity and probiotic potential of *Bifidobacterium* and *Lactobacillus* against species of *Clostridium*. *Nutrients* 11(2):448. <https://doi.org/10.3390/nu11020448>
53. Vanajakshi V, Vijayendra SVN, Varadaraj MC, Venkateswaran G, Agrawal R (2015) Optimization of a probiotic beverage based on Moringa leaves and beetroot. *LWT* 63(2):1268–1273. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2015.04.023>
54. Anjana TSK (2022) Bacteriocin-producing probiotic lactic acid bacteria in controlling dysbiosis of the gut microbiota. *Front Cell Infect Microbiol* 12:851140. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2022.851140>
55. Kiouisi DE, Efstathiou C, Tzampazlis V, Plessas S, Panopoulou M, Koffa M et al (2023) Genetic and phenotypic assessment of the antimicrobial activity of three potential probiotic lactobacilli against human enteropathogenic bacteria. *Front Cell Infect Microbiol* 13:1127256. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2023.1127256>
56. Mishra V, Shah C, Mokashe N, Chavan R, Yadav H, Prajapati J (2015) Probiotics as potential antioxidants: a systematic review. *J Agric Food Chem* 63(14):3615–3626. <https://doi.org/10.1021/jf506326t>
57. Küçüköz K, Kruk M, Kołożyn-Krajewska D, Trzaskowska M (2024) investigating the probiotic potential of vegan puree mixture: viability during simulated digestion and bioactive compound bioaccessibility. *Nutrients* 16(4):561. <https://doi.org/10.3390/nu16040561>
58. Afzaal M, Saeed F, Shah YA, Hussain M, Rabail R, Socol CT et al (2022) Human gut microbiota in health and disease: Unveiling the relationship. *Front microbiol* 13:999001. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2022.999001>
59. Li R, Wang Z, Kong KW, Xiang P, He X, Zhang X (2022) Probiotic fermentation improves the bioactivities and bioaccessibility of polyphenols in *Dendrobium officinale* under in vitro simulated gastrointestinal digestion and fecal fermentation. *Front Nutr* 9:1005912. <https://doi.org/10.3389/fnut.2022.1005912>
60. Setchell KD, Mourvaki E, Clerici C, Mattioli S, Brecchia G, Castellini C (2022) Dietary isoflavone aglycons from soy germ pasta improves reproductive performance of aging hens and lowers cholesterol levels of egg yolk. *Metabolites* 12(11):1112. <https://doi.org/10.3390/metabo12111112>
61. Su Y, Chen S, Shen J, Yi Z, Liu S, Cai S et al (2022) Screening and molecular mechanisms of novel ACE-inhibitory peptides from *Gracilariopsis lemaneiformis*. *Int J Mol Sci* 23(23):14850. <https://doi.org/10.3390/ijms232314850>
62. Cele NP, Akinola SA, Shoko T, Manhevi VE, Remize F, Sivakumar D (2022) The bioaccessibility and antioxidant activities of fermented mango cultivar juices after simulated in vitro digestion. *Foods* 11(17):2702. <https://doi.org/10.3390/foods11172702>
63. Denzer I, Münch G, Pischetsrieder M, Friedland K (2016) S-allyl-L-cysteine and isoliquiritigenin improve mitochondrial function in cellular models of oxidative and nitrosative stress. *Food Chem* 194:843–848. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2015.08.052>
64. Leis R, Castro MJ, Lamas C, Picáns R, Couce ML (2020) Effects of prebiotic and probiotic supplementation on lactase deficiency and lactose intolerance: a systematic review of controlled trials. *Nutrients* 12(5):1487. <https://doi.org/10.3390/nu12051487>
65. Ba Z, Lee Y, Meng H, Kris-Etherton PM, Rogers CJ, Lewis ZT et al (2021) Matrix effects on the delivery efficacy of *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* BB-12 on fecal microbiota, gut transit time, and short-chain fatty acids in healthy young adults. *Mosphere* 6(4):10–1128. <https://doi.org/10.1128/msphere.00084-21>

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

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

