

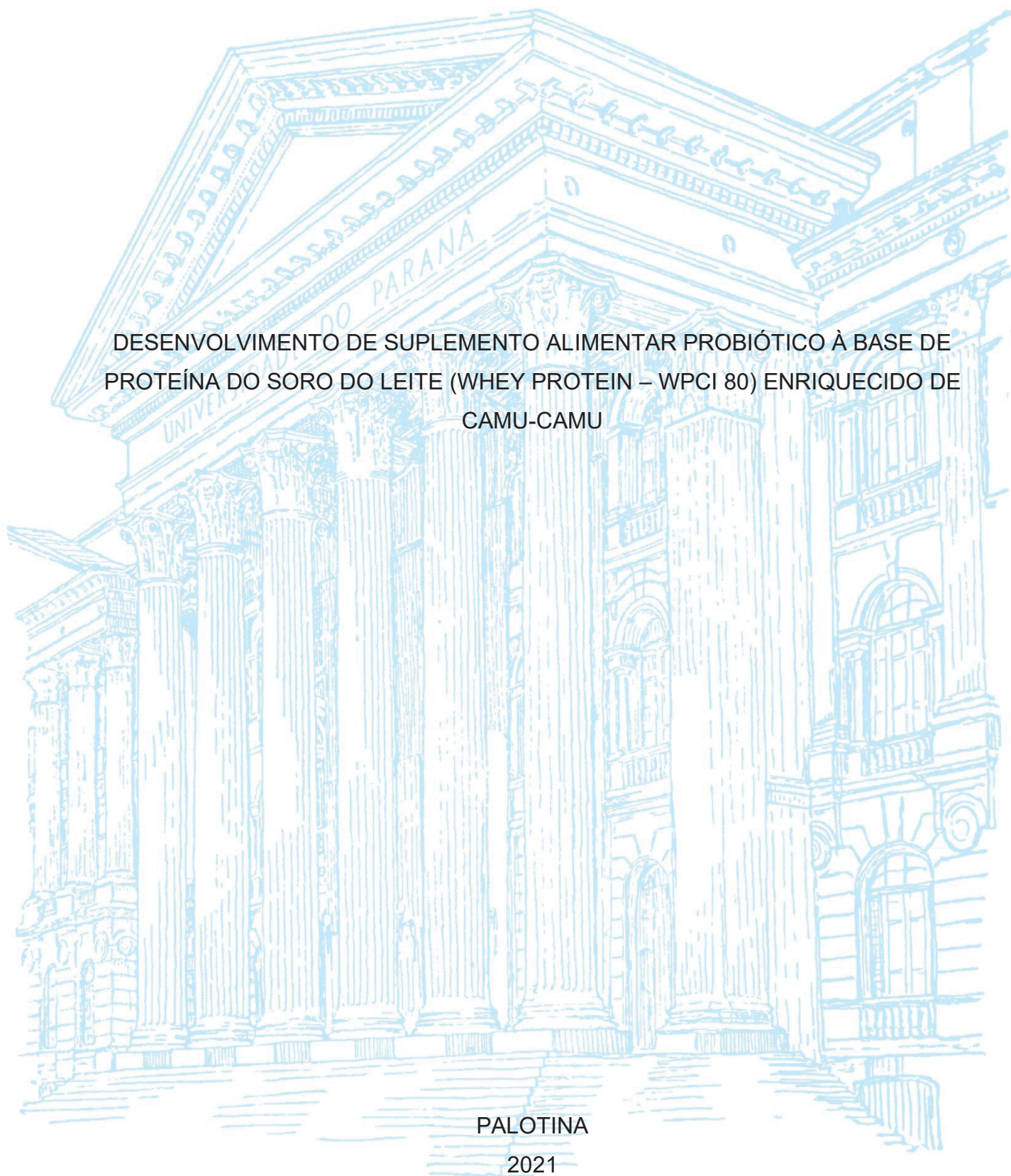
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

GRAZIELLA MELISSA DE VIGNALLI FLORENCE MIOLA

DESENVOLVIMENTO DE SUPLEMENTO ALIMENTAR PROBIÓTICO À BASE DE  
PROTEÍNA DO SORO DO LEITE (WHEY PROTEIN – WPCI 80) ENRIQUECIDO DE  
CAMU-CAMU

PALOTINA

2021



GRAZIELLA MELISSA DE VIGNALLI FLORENCE MIOLA

DESENVOLVIMENTO DE SUPLEMENTO ALIMENTAR PROBIÓTICO À BASE DE  
PROTEÍNA DO SORO DO LEITE (WHEY PROTEIN – WPCI 80) ENRIQUECIDO DE  
CAMU-CAMU

Dissertação apresentada como requisito parcial à  
obtenção do título de Mestre, Curso de Programa  
de Pós-Graduação Stricto Sensu em Biotecnologia,  
Setor de Palotina - Paraná, Universidade Federal  
do Paraná

Orientadora: Profa. Dra. Ana Carla Zarpelon Schutz

Coorientadora: Profa. Dra. Leticia Lopes Ricardo

PALOTINA 2021

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ. SISTEMA DE BIBLIOTECAS.  
CATALOGAÇÃO NA FONTE

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

M669 Miola, Graziella Melissa de Vignalli Florence  
Desenvolvimento de suplemento alimentar probiótico à base de proteína do soro do leite (Whey protein – WPCI 80) enriquecido de Camu-camu / Graziella Melissa de Vignalli Florence Miola – Palotina, 2021.  
62f.

Orientadora: Ana Carla Zarpelon Schutz  
Coorientadora: Letycia Lopes Ricardo  
Dissertação (mestrado) – Universidade Federal do Paraná, Setor Palotina, Programa de Pós-graduação em Biotecnologia.

1. Probiótico. 2. Vitamina C. 3. Camu-Camu. 4. Whey protein.  
I. Schutz, Ana Carla Zarpelon. II. Ricardo, Letycia Lopes. III. Universidade Federal do Paraná. IV. Título.

CDU 637

Ficha catalográfica elaborada por Lilliane Cristina Soares Sousa – CRB 9/1736



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO  
SETOR PALOTINA  
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ  
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO BIOTECNOLOGIA -  
40001016083P6

## TERMO DE APROVAÇÃO

Os membros da Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação BIOTECNOLOGIA da Universidade Federal do Paraná foram convocados para realizar a arguição da dissertação de Mestrado de **GRAZIELLA MELISSA DE VIGNALLI FLORENCE MIOLA** intitulada: **DESENVOLVIMENTO DE SUPLEMENTO ALIMENTAR PROBIÓTICO À BASE DE PROTEÍNA DO SORO DO LEITE (WHEY PROTEIN - WPCI 80) ENRIQUECIDO DE CAMU-CAMU**, sob orientação da Profa. Dra.

ANA CARLA ZARPELON SCHUTZ, que após terem inquirido a aluna e realizada a avaliação do trabalho, são de parecer pela sua APROVAÇÃO no rito de defesa.

A outorga do título de mestra está sujeita à homologação pelo colegiado, ao atendimento de todas as indicações e correções solicitadas pela banca e ao pleno atendimento das demandas regimentais do Programa de Pós-Graduação.

PALOTINA, 17 de Dezembro de 2021.

**Assinatura Eletrônica**

06/01/2022 15:25:04.0

**ANA CARLA ZARPELON SCHUTZ**

**Presidente da Banca Examinadora**

**Assinatura Eletrônica**

21/12/2021 17:31:04.0

**KÁDIMA NAYARA TEIXEIRA**

**Avaliador Externo (UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ)**

**Assinatura Eletrônica**

21/12/2021 17:14:52.0

**ARACELI SCALCON**

**Avaliador Externo (PARQUE CIENTÍFICO E TECNOLÓGICO DE BIOCÊNCIAS)**



Aos amigos do laboratório, Elton, Claudinei e em especial à Cláudia por seu acolhimento e indescritível ajuda e apoio em todas as etapas analíticas deste trabalho, obrigada pela imensa ajuda no laboratório.

Meu muito obrigado à minha orientadora Dra. Ana Carla Zarpelon, por aceitar me orientar, pela amizade, pela paciência e pela contribuição para o meu crescimento profissional acreditando no desenvolvimento desse projeto.

Ao Biopark, por sempre atender às minhas necessidades, compreendendo e me auxiliando na flexibilidade de horário para a realização do mestrado. Muito obrigada!

Aos amigos da Empresa Prati Donaduzzi e Biosamer, que diretamente contribuíram muito para a concretização do mestrado para a realização desta pesquisa. Meu obrigado especial, ao Felipe.

Enfim, agradeço também a todas as pessoas que não tiveram os nomes citados, mas que de certa forma, me ajudaram a concretizar este sonho, colaborando com ideias, sugestões, críticas ou apenas com carinho, amizade e afeto. Muito obrigada!

## RESUMO

Os suplementos alimentares, são preparações destinadas a fornecer nutrientes bioativos visando atender a demanda do organismo humano. Assim, o objetivo do trabalho foi elaborar um suplemento alimentar probiótico a base de Whey Protein WPCI 80% enriquecido com extrato de camu-camu, destinado a praticantes de esportes. O microorganismo probiótico utilizado foi o *Bacillus coagulans*, o soro de leite foi utilizado como fonte de proteína e o extrato de camu-camu pela alta concentração de vitamina C. Para a formulação elaborada, os excipientes propostos foram utilizados a fim de garantir a estabilidade, além de melhorarem as características organolépticas do produto final. O teor de vitamina C do extrato de camu-camu foi determinado pelo método iodométrico, apresentando valor de 15,84 g / 100 gramas do extrato. A proteína bruta do insumo Whey protein e do produto final, foi determinada através do processo Kjeldahl, apresentando 77,46 e 48,24 g/ 100 gramas do produto, respectivamente. O suplemento desenvolvido apresentou alto valor biológico em proteína e probióticos, além da presença de vitamina C com grande potencial antioxidante, inibindo as lesões causadas pelos radicais livre oriundo do estresse oxidativo.

**Palavras-chave:** probiótico; vitamina C; Camu-Camu; whey protein; suplemento.

## ABSTRACT

Dietary supplements are preparations designed to provide bioactive nutrients in order to meet the demands of the human body. Thus, this paper aimed to elaborate a probiotic dietary supplement based on Whey Protein WPCI 80% enriched with camu-camu extract, which is intended for sports practitioners. The probiotic microorganism used was *Bacillus coagulans*, whey was used as a protein source and camu-camu extract was used due to the high concentration of vitamin C. For the elaborated formulation, the proposed excipients have been used in order to guarantee stability, in addition to improving the organoleptic characteristics of the final product. The vitamin C content of camu-camu extract was determined by the iodometric method, with a value of 15.84 g/100 grams of extract. The crude protein of the Whey protein input and of the final product was determined through the Kjeldahl method, presenting 77.46 and 48.24 g/100 grams of the product, respectively. The developed supplement showed high biological value in protein and probiotics, in addition to the presence of vitamin C with great antioxidant potential, inhibiting damage caused by free radicals arising from oxidative stress.

**KEYWORDS:** probiotics. vitamin C. camu-camu. whey protein. supplement.

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO .....</b>	<b>8</b>
1.1 CONCENTRADO PROTEICO DE SORO DE LEITE EM PÓ INSTANTÂNEO (WPCI 80).....	8
1.2 MICROBIOTA.....	14
1.3 PROBIÓTICOS .....	17
1.3.1 <i>Bacillus coagulans</i> .....	19
1.4 CAMU-CAMU .....	22
1.5 SUPLEMENTOS ALIMENTARES .....	28
<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>32</b>

## 1 INTRODUÇÃO

### 1.1 CONCENTRADO PROTEICO DE SORO DE LEITE EM PÓ INSTANTÂNEO (WPCI 80)

Desde a antiguidade um problema fundamental da humanidade é conseguir comida suficiente. Durante o período mesolítico, com a transição das comunidades nômades às sedentárias, surgiram os primeiros relatos do uso do leite de mamíferos na alimentação humana. No entanto, dependendo do aumento do conhecimento sobre nutrição, comer alimentos de alto valor nutricional torna-se cada vez mais importante (BENEVIDES; VEIGA, 2014).

O leite é reconhecido como o alimento mais completo da natureza, apresentando importantes componentes nutricionais como proteínas, as quais são agrupadas em duas grandes classes: caseínas (80%) e proteínas do soro 20% (albuminas - 16% e globulinas - 4%, percentual esse que pode variar de acordo com a raça do gado e sua alimentação), carboidratos e minerais, entre outros (AGUIAR; CORÓ; PEDRÃO, 2005), além da maioria das vitaminas solúveis, como as vitaminas B12, a vitamina B6, ácido pantotênico, riboflavina, tiamina, vitamina C, retinol (vitamina A), e sais minerais (ANTUNES, 2003; HARAGUCHI; ABREU; PAULA, 2006; METSÄMUURONEN; NYSTYÖM, 2009; MILLER; JARVIS; MCBEAN, 2000).

Atualmente, esse alimento é notabilizado sob novas perspectivas, em virtude da extensa variedade de compostos bioativos (CBA) presentes tanto no alimento *in natura*, quanto em seus derivados, como os queijos e os iogurtes (MÖLLER et al., 2008). Dentre esses compostos, incluem-se os peptídeos bioativos (PBA), os ácidos graxos e os oligossacarídeos. O alto valor nutritivo das proteínas do soro do leite deve-se principalmente ao alto conteúdo de aminoácidos essenciais e seu valor biológico (RENNER, 1992; SMITHERS, 2008).

Segundo a Instrução Normativa nº 94, de 18 de setembro de 2020 do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA), entende-se por soro do leite o produto lácteo líquido extraído da coagulação do leite utilizado no processo de fabricação de queijos, caseína alimentar e produtos similares (ANVISA, 2020).

O soro do leite é o líquido obtido na produção de queijos, pela separação do coágulo (caseína) do leite integral (ORDÓÑEZ, 2005). Após a produção de queijos, a variação de sobra é de aproximadamente 80 a 90% do soro, ou seja, em média, para

cada 1 kg de queijo produzido, tem-se uma produção equivalente a 9 litros de soro. sendo que o soro contém cerca de 55% dos nutrientes do leite *in natura*, como as proteínas solúveis, lactose, minerais, vitaminas e pouca quantidade de gordura. A produção de queijos em 2017 atingiu 1 milhão de toneladas, um crescimento correspondente a 2% sobre o ano anterior, quantidade esta que corresponde a uma produção superior a 9 milhões de toneladas de soro de queijo (EMBRAPA, 2018).

Apesar de ter sido considerado um subproduto, o soro do leite devido ao seu alto valor funcional e nutricional, conferido pela presença de proteínas com elevado valor de aminoácidos essenciais e ainda propriedades funcionais relevantes, o soro do leite hoje é considerado um coproduto da fabricação de queijos em razão das aplicações técnicas e nutricionais (ANON, 1997; NEVES, 2001).

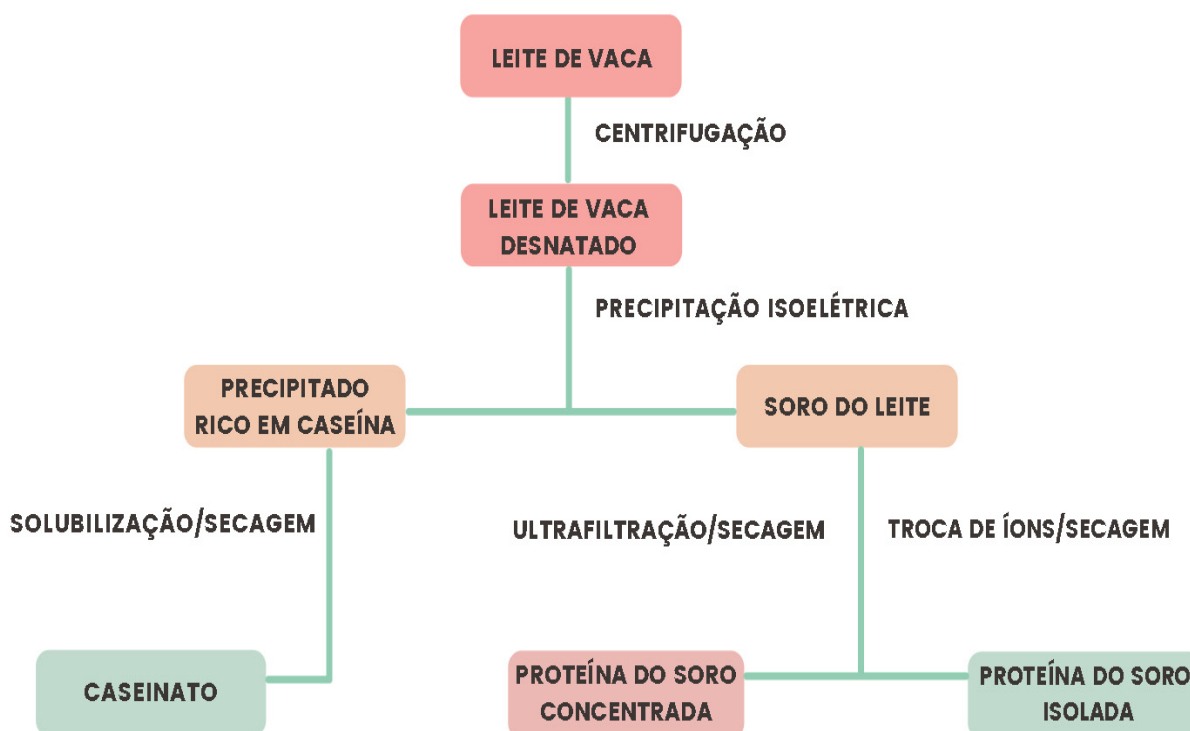
Como os aminoácidos essenciais não podem ser sintetizados no corpo, eles são encontrados no soro do leite, e são suficientemente equilibrados (GÜRSEL, 2015), sendo necessários para estimular a síntese de proteínas musculares, como exemplo a leucina (HA; ZEMEL, 2003; HULMI; LOCKWOOD; STOUT, 2010; KATSANOS et al., 2006; PENNINGG et al., 2012; VOLPI et al., 2003).

Embora se tenha registros de sua utilização datados de cerca de 3000 anos atrás, somente nas últimas décadas o soro do leite vem recebendo atenção como componente a ser utilizado na alimentação humana, seja incorporado a diferentes produtos alimentícios, seja como fonte proteica em suplementos destinados às dietas para atletas, conhecido como *whey*, termo inglês para soro do leite (HARAGUCHI; ABREU; PAULA, 2006; LACROIX et al., 2006; SMITHERS, 2008).

*Whey Protein* (WP) é um suplemento nutricional oral (ONS) alternativo, adequado para pessoas saudáveis, atletas ou para pacientes com deficiências nutricionais, devido à sua composição livre de lactose e gordura, proteína de alta qualidade com excelentes perfis de aminoácidos e alta digestibilidade (HA; ZEMEL, 2003). As proteínas do soro do leite usadas na maioria das aplicações de alimentos e bebidas apresenta-se em 3 formas: soro em pó, cuja concentração de proteínas pode variar de 11 a 14,5%; concentrado de proteínas de soro do leite (WPC), que pode variar em concentração de proteínas de 35 a 89% e apresenta maior teor de gorduras e carboidratos; e isolado de proteínas de soro do leite (WPI), que contém 90% ou mais de concentração de proteínas, após a remoção dos componentes não proteicos (USDEC, 2008; WRIGHT et al., 2009).

Para a separação dessas proteínas, o leite é inicialmente submetido ao processo de centrifugação, que irá separar a nata. Em seguida, o leite desnatado, é submetido à precipitação isoelétrica em pH 4,6, originando o precipitado rico em caseínas e o soro do leite, também conhecido como *Whey Protein*. Além disso, os caseinatos são obtidos a partir da solubilização do precipitado ácido de caseínas em meio básico até atingir, aproximadamente, pH 6,7 e da secagem desse subproduto, enquanto os concentrados e isolados de proteínas do soro são obtidos a partir dos processos de ultrafiltração e troca de íons, respectivamente, com subsequente secagem (Figura 1) (LIVNEY, 2010).

Figura 1 - Fluxograma dos processos para separação das proteínas do leite



Fonte: Adaptado de Pimentel et al. (2019).

Segundo Bounous (2001), os benefícios do WP incluem suporte do sistema imunológico, melhorou a força e síntese muscular e também o metabolismo. Em termos de suporte imunológico, o WP pode aumentar a função da glutathione (GSH) porque a suplementação enriquecida com aminoácidos não essenciais como cisteína, glicina e glutamina podem diminuir a formação de radicais oxidativos e prevenir a infecção (HA; ZEMEL, 2003; RIPPLE, 1997).

As vantagens das proteínas do soro em termos de anabolismo muscular podem estar relacionadas à sua rápida taxa de absorção e abundância de leucina para iniciar a síntese, bem como sua composição de aminoácidos para fornecer substrato para a síntese de proteínas (GÜRSEL, 2015).

De acordo com o método utilizado, o soro pode ser classificado em soro ácido com o pH menor que 5, este pH é atingido a partir da coagulação do leite utilizando um ácido, e em soro doce, com pH variando entre 6 e 7, obtido pela inoculação de enzimas como a quimosina (ANON, 1997, KOSSEVA et al., 2009; YADAV et al., 2015). Sobretudo, existem três classificações do produto: o concentrado, o isolado e o hidrolisado (CANO, 2017; OLIVEIRA et al., 2018).

O soro do leite contém proteínas com uma estrutura globular com algumas pontes de dissulfeto, contendo certo grau de estabilidade estrutural. O conteúdo desses depende da espécie, porém em menor grau que a gordura, podendo variar sua proporção de proteína de 1% até 14%, estando ligada com o percentual de gordura. As principais frações ou peptídeos bioativos (PBA) do soro são constituídos de: alfa-lactoalbumina, beta-lactoglobulina, imunoglobulinas e glicomacropéptídeos (GMP), e em menor quantidade, mas com aplicações comerciais estão a lactoferrina, lactoperoxidase, albumina, sendo estas, presentes em todos os tipos de leite (HARAGUCHI; ABREU; PAULA, 2006; SMITHERS, 2008; VIDAL; SARAN NETTO, 2018; YERLIKAYA; KINIK; AKBULUT, 2010).

A Alfa-lactoalbumina é o segundo peptídeo bioativo (PBA) do soro (15%-25%), caracterizado por ser de fácil e alta digestão. Possui alto teor de triptofano (6%), rica em lisina, leucina, treonina (aminoácidos essenciais) e cistina (aminoácido não essencial). Precursora da biossíntese de lactose no tecido mamário, tem grande capacidade de se ligar a minerais como cálcio e zinco, o que afeta positivamente sua absorção. Apresenta também ação antimicrobiana, contra bactérias como *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* e *Klebsiella pneumoniae* (HARAGUCHI; ABREU; PAULA, 2006).

A Beta-lactoglobulina é o maior peptídeo bioativo (PBA) do soro, representando no leite, cerca de 3,2g/L (45,0%-57,0%), apresenta uma forte resistência a ação de ácidos e enzimas proteolíticas presentes no estômago, sendo absorvida no intestino delgado. É uma proteína tipicamente globular e encontra-se entre as principais proteínas a serem cristalizadas, sendo uma importante proteína carreadora do retinol

em animais. É a principal proteína do soro do leite dos bovinos, ovinos e caprinos (ANTUNES, 2003; HARAGUCHI; ABREU; PAULA, 2006).

Primorosas fontes de minerais como cálcio, magnésio e fósforo são encontrados no soro e nos concentrados do soro. Na indústria de alimentos, concentrados e isolados de proteína do soro do leite são valiosos como ingredientes alimentares, podendo ser incorporados a produtos fortificados, aumentando desta forma, o teor de nutrientes minerais do produto final, melhorando a qualidade e o conteúdo da proteína de muitos produtos alimentícios, não apenas por sua capacidade de agregar e fornecer estrutura aos alimentos, mas porque são altamente solúveis em uma ampla faixa de pH (MATTILA-SANDHOLM; SAARELA, 2003; SMITHERS, 1996).

Esta propriedade os torna adequados para uso em aplicações como bebidas esportivas e substitutos de refeições líquidas. A capacidade dos produtos de proteína do soro do leite de se ligar à água e suas características de gelificação, contribuem para sua aplicabilidade como ingredientes em produtos de panificação e carnes processadas. Como emulsificantes, as proteínas do soro do leite concentradas encontram ampla aplicação na formulação de molhos para salada, cremes de café artificiais, bebidas proteicas nutricionais, sopas com creme e alimentos funcionais. (SMITHERS, 1996).

Sendo assim, tanto Alfa-lactoalbumina quanto Beta-lactoglobulina, são usadas como ingredientes nutricionais especializados em alimentos fisicamente funcionais, e componentes de proteínas menores são usados como ingredientes alimentares especializados e importantes reagentes biotecnológicos (SMITHERS, 1996).

As imunoglobulinas (Ig), a lactoferrina e a lactoperoxidase, também podem ser chamadas de “proteínas do colostro” devido aos altos níveis existentes no colostro, fornecem a função de anticorpos e compreendem 10% das proteínas do soro do leite, e estão associados ao desenvolvimento da imunidade de neonatos. Existem cinco classes principais de imunoglobulinas: IgA, IgG, IgM, IgE e IgD, sendo a IgG o tipo dominante de imunoglobulinas no soro do leite de vaca (AGUIAR; CORÓ; PEDRÃO, 2005; METIN, 2005).

Fatores como glicomacropéptídeos, foram identificados por apresentarem efeito protetor para microbiota intestinal. São péptídeos resistentes ao calor, à digestão assim como a mudanças de pH (WALZEM; DILLARD; GERMAN, 2002). Essa fração está presente em um tipo de proteína do soro, conhecida como whey

rennet, cuja apresenta alta carga negativa, que favorece a absorção de minerais pelo epitélio intestinal, e, assim como a fração beta-lactoglobulina, possui alto teor de aminoácidos essenciais (47%).

*Whey Protein* e seus concentrados constituem uma fonte rica em aminoácidos contendo enxofre (cisteínas e metioninas), que são substratos importantes na biossíntese de glutathione, um importante antioxidante e potente estimuladora da proliferação e atividade de leucócitos, e conseqüentemente das funções imunológicas (BALLATORI et al., 2009; GRAF; EGERT; HEER, 2011).

A lactoferrina é a proteína dominante no soro do leite humano, sua concentração (2 a 4 g/L no colostro e 6 a 8 g/L no leite maduro) é superior em relação ao soro do leite de vaca (1,5 a 5 g/L no colostro e 0,1 g/L no leite maduro) mesmo a lactoferrina do soro do leite de vaca sendo homóloga à dos humanos. A lactoperoxidase, por sua vez é o maior agente antibacteriano presente no colostro, atuando na catalisação do processo oxidativo do tiocianato (HARAGUCHI; ABREU; PAULA, 2006; METSÄMUURONEN; NYSTYÖM, 2009).

A albumina não é sintetizada na glândula mamária, aparece no leite após vazamento passivo da corrente sanguínea, e presume-se que a albumina penetre no leite por mecanismos transcitóticos inespecíficos, ou seja, “vazamento”, embora possa haver um mecanismo de transporte mais específico. A concentração de albumina no soro do leite aumenta durante a mastite e durante a involução mamária. Representando cerca de 10% do soro do leite, a albumina é rica em cistina e é um precursor da síntese de glutathione. Apresenta grande afinidade por ácidos graxos livres e lipídeos, o que favorece seu transporte na corrente sanguínea (HARAGUCHI; ABREU; PAULA, 2006; METIN, 2005).

Os produtos que estão presentes no comércio contêm pequenas concentrações de gordura, com alto teor de aminoácidos essenciais e proteína, utilizados para ganho muscular de massa magra, afim de melhorar o desempenho físico (CANO, 2017). Além de promover o aumento de massa muscular em estados catabólicos, como câncer, hepatopatias e sepse, bem como casos de sarcopenia (FOEGEDING et al., 2002; GRAF; EGERT; HEER, 2011; LANCHI et al., 2016; MARSHALL, 2004).

## 1.2 MICROBIOTA

O ser humano possui composição bacteriana distinta, definida pelos fatores ambientais, modo de nascimento, aleitamento materno nos primeiros meses de vida, idade e estilo de vida. O intestino humano é talvez uma das redes mais complexas do corpo e é colonizado por trilhões de microorganismos, incluindo bactérias presentes no cólon de um ser humano adulto (Tabela 1), arqueias com menos de 1%, fungos e protistas também estão presentes, com pouca contribuição em termos de números de células, enquanto vírus/fagos podem exceder em número as células bacterianas. No entanto, as bactérias são os principais habitantes, que o torna um verdadeiro ecossistema, essencial para a absorção eficiente de nutrientes e para a manutenção da saúde geral (GIL; BENGMARK, 2006; GILL et al., 2006; OLIVEIRA, 2016).

A microbiota corresponde a cerca de 100 trilhões de microorganismos que vivem no trato gastrointestinal (GI). Desta comunidade, em torno de 90% das bactérias são dos filos Bacteroidetes (Gram-negativos) e Firmicutes (Gram-positivos). Adicionalmente também estão presentes os filos Actinobacteria (Gram-positiva) em especial a *Bifidobacterium*, Proteobactérias e Verrucomicrobia (Gram-negativas) em especial a *Akkermansia muciniphila* (SINGH et al., 2019).

Tabela 1 - Microorganismos no cólon do ser humano

Estômago e duodeno	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Quantidades muito baixas de microorganismos: &lt;math&gt;10^3&lt;/math&gt; células bacterianas por grama de conteúdo</li> <li>• Principalmente lactobacilos e estreptococos</li> <li>• As secreções ácidas, biliares e pancreáticas suprimem a maioria dos micróbios ingeridos</li> <li>• A atividade motora fásica propulsiva impede a colonização estável do lúmen (igualmente no intestino delgado)</li> </ul>
Jejuno e íleo	<ul style="list-style-type: none"> <li>• O número de bactérias aumenta progressivamente de <math>10^4</math> células no jejuno a <math>10^7</math> células por grama de conteúdo íleo distal</li> </ul>
Intestino grosso	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Densamente povoado por anaeróbios: <math>10^{12}</math> células por grama de conteúdo luminal.</li> </ul>

Fonte: GUARNER, et al., adaptada pelos autores (2021).

A microbiota intestinal possui espécies que são residentes permanentes, denominadas autóctones, e espécies transitórias, adquiridas no nosso contato com o meio externo e chamadas alóctones. Essa grande diversidade de espécies bacterianas na microbiota intestinal decorre das quantidades elevadas de substratos fermentáveis provenientes da dieta (BEDANI; ROSSI, 2009).

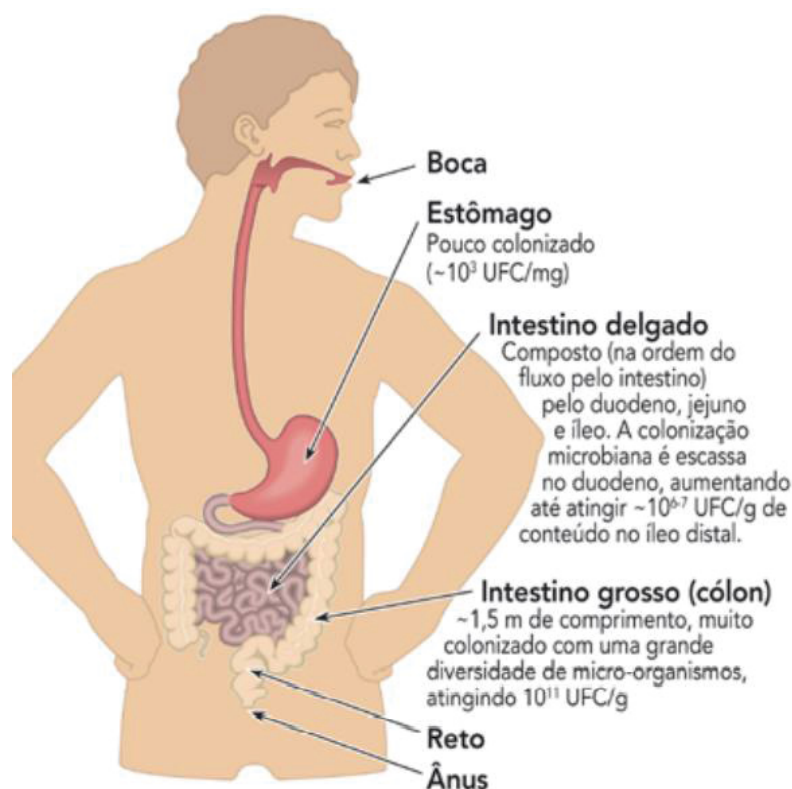
A maioria dos indivíduos adultos possui variações na proporção das bactérias em consequência de influências ambientais, como alimentação, prática de exercício físico, ambiente em que vive, consumo de medicamentos como antibiótico e/ou estados patológicos (GOHIR et al., 2015; GREEN et al., 2017; MORAES et al., 2014; SRINIVASAN et al., 2018).

Todos esses micro-organismos residentes em nosso corpo são chamados de microbiota e seus genomas são conhecidos como microbioma. Nossa microbiota tem uma função tripla: protetora, trófica e metabólica. Possui uma barreira e efeito protetor contra patógenos. Em sua função trófica, controla a proliferação e diferenciação das células epiteliais intestinais e contribui para o desenvolvimento e homeostase do sistema imunológico. Reconhecimento mais recente de sua função metabólica, que inclui a fermentação de resíduos indigestíveis da dieta e muco endógeno (FLINT et al., 2012).

As bactérias coabitam normalmente com humanos e encontram-se associadas a vários tecidos, incluindo a pele, o trato vaginal, o trato respiratório e o trato gastrointestinal. A maioria das bactérias do intestino é encontrada no intestino grosso (cólon) e, nos últimos 30 anos ou mais, o interesse na população microbiana intestinal, a microbiota, e em seu ambiente tem se intensificado. Muitas pesquisas demonstraram que os residentes habituais do intestino (microorganismos comensais) estão longe de ser apenas habitantes passivos do trato gastrointestinal, mas interagem com seu hospedeiro de forma bastante intrincada (FLINT et al., 2012).

A microbiota gastrointestinal (Figura 2) é um ecossistema complexo e metabolicamente ativo que desempenha um papel importante na saúde e na doença, apresenta uma variação em número, diversidade, composição e atividade dependendo da região do trato gastrointestinal (TGI). O estômago, com seu ambiente fortemente ácido e trânsito rápido, abriga um número relativamente pequeno de bactérias (aproximadamente 10<sup>3</sup>/mL), enquanto o ambiente levemente ácido e trânsito mais lento no cólon permitem números muito maiores (aproximadamente 10<sup>12</sup>/g) e maior diversidade (SEKIROV et al., 2010).

Figura 2 - Trato gastrointestinal humano e as unidades formadoras de colônias (UFC)



Fonte: Adaptado de Sanders (2007).

É na microbiota intestinal que os nutrientes ingeridos na dieta são transformados em produtos metabólicos que irão afetar a saúde intestinal, conseqüentemente, a saúde do indivíduo. A alimentação está diretamente associada ao equilíbrio da microbiota e à integridade da mucosa intestinal. Uma vez que esse equilíbrio se rompe, instala-se um quadro de disbiose intestinal (GREEN et al., 2017).

Como a microbiota intestinal é tipicamente considerada a primeira linha de defesa contra micro-organismos patogênicos no intestino, é essencial manter a simbiose por meio do consumo regular de alimentos probióticos e suplementos (MONTECINO; BERENT-MAOZ; DORSHKIND, 2013).

A modulação da microbiota intestinal pelos microrganismos probióticos ocorre através de um mecanismo denominado "exclusão competitiva". Os probióticos auxiliam a recompor a microbiota intestinal, através da adesão e colonização da mucosa intestinal, ação esta que impede a adesão e subsequente produção de toxinas ou invasão das células epiteliais (dependendo do mecanismo de patogenicidade) por bactérias patogênicas (VANDENPLAS, 2014).

### 1.3 PROBIÓTICOS

Desde as descobertas de Metchnikoff em Tripathi e Giri (2014), os microrganismos probióticos têm recebido atenção pelas propriedades benéficas em humanos e animais, o que tem levado à sua aplicação em diversos veículos alimentares (TRIPATHI; GIRI, 2014).

Fuller (1989), para apontar a natureza microbiana dos probióticos, redefiniu a palavra como “um suplemento de alimento microbiano vivo que afeta benéficamente o animal hospedeiro, melhorando o equilíbrio intestinal”. Em 2001, a *Food and Agriculture Organization of the United Nations* (FAO) e a Organização Mundial da Saúde (OMS) redefiniram probióticos como “microorganismos vivos que quando administrados em quantidades adequadas conferem benefícios à saúde do hospedeiro”, sendo esta definição adotada pela ANVISA (ANVISA, 2018; FAO, 2006).

A ciência relacionada aos probióticos é recente e, portanto, está em constante evolução. Probióticos usados em alimentos, fornecidos como suplemento dietético ou como componentes ativos de um medicamento registrado, devem conter pelo menos  $10^7$  - $10^9$  UFC/ g de micro-organismos probióticos e devem sobreviver até o final da vida útil e não devem apenas ser capazes de sobreviver à passagem pelo trato digestivo, exibindo resistência ao ácido e a bile, mas também devem ter a capacidade de proliferar no intestino. Os probióticos devem ser capazes de exercer seus benefícios no hospedeiro por meio do crescimento ou atividade no corpo humano. Os estudos clínicos devem ser realizados com o produto comercializado e não com a cepa isolada (ÇOMAK GÖÇER et al., 2016; LEBEER et al., 2017; VANDENPLAS, 2012).

Para fornecer benefícios à saúde, as cepas probióticas geralmente requerem uma matriz específica para garantir a sobrevivência da cepa ideal ao longo do trato gastrointestinal. Além da incorporação de probióticos em produtos alimentícios, as cepas probióticas também são fornecidas como suplementos alimentares, muitas vezes visando problemas de saúde específicos (POSSEMIERS et al., 2010).

Os produtos probióticos foram desenvolvidos para melhorar as condições fisiológicas em diferentes locais do corpo. Embora o trato gastrointestinal seja o alvo mais importante para a maioria das aplicações de probióticos, outros locais do corpo, como a boca, o trato urogenital e a pele também são considerados e sua aplicação também pode atingir subpopulações humanas específicas: indivíduos saudáveis,

crianças, idosos, indivíduos doentes e imunocomprometidos e indivíduos geneticamente predispostos, entre outros (VANDENPLAS, 2014).

Há uma infinidade de cepas probióticas e aplicações disponíveis com o trato gastrointestinal como local de destino. Tais aplicações visam vários benefícios à saúde, como diminuir a colonização de patógenos, melhorar a síntese de vitaminas, otimizar o trânsito intestinal, aliviar a intolerância à lactose, reduzir o inchaço e promover efeitos imunomoduladores (VANDENPLAS, 2014).

Em muitos casos, os benefícios à saúde só são obtidos quando uma cepa probiótica atinge o local alvo em um estado metabolicamente ativo e em número suficiente. Para administração oral, os microrganismos probióticos devem sobreviver aos diferentes estresses físico-químicos, enzimáticos e microbianos durante o trânsito gastrointestinal. Em primeiro lugar, os microrganismos têm que atravessar o ambiente ácido do estômago. Além disso, a ausência ou presença de uma matriz alimentar determina significativamente o perfil de pH ao qual a cepa probiótica é submetida. Em segundo lugar deve apresentar a característica da sobrevivência da cepa probiótica e a capacidade de colonizar o trato gastrointestinal devendo ocupar um nicho funcional no ecossistema microbiano intestinal deixados em aberto pela comunidade endógena, evitando assim que patógenos (oportunistas) ocupem esse nicho (COOK et al., 2012).

Embora o efeito tampão do pH inicial dos alimentos possa sujeitar a cepa probiótica a condições ácidas inicialmente menos rigorosas, um tempo de digestão mais longo no estômago sob condições de alimentação pode expor parte do probiótico dosado a condições ácidas por um tempo mais longo. Muitos microrganismos probióticos foram selecionados por sua maior resiliência em tais condições, e novas metodologias estão disponíveis para permitir o encapsulamento de cepas probióticas para esse fim (COOK et al., 2012).

Lactobacilos e bifidobactérias são os grupos de probióticos mais comuns, outros gêneros também são comercializados como probióticos, como *Escherichia coli*, *Saccharomyces cerevisiae* var. *boulardii*. Além disso, “novas” espécies de micróbios benéficos são identificadas e estão sendo investigadas por seu potencial como probióticos, *Akkermansia muciniphila*, *Bacillus coagulans*, *Eubacterium halii* e *Faecalibacterium prausnitzii*. A segurança é uma característica essencial de qualquer cepa probiótica comercializada, da qual muitas têm aprovação regulatória de segurança em nível de espécie devido ao longo histórico de consumo (EFSA, 2009).

Segundo Fijan (2014), os benefícios dos probióticos para a saúde podem se manifestar de várias maneiras, através da saúde digestiva, imunológica, metabólica e até mental do hospedeiro. O consenso geral é que os benefícios à saúde são específicos à cepa e não podem ser extrapolados para outras cepas, nem mesmo da mesma espécie.

As bactérias probióticas têm muitas propriedades benéficas para controlar a capacidade das bactérias patogênicas. Muitos probióticos produzem compostos antimicrobianos, como, por exemplo, ácidos graxos de cadeia curta e outros ácidos orgânicos como por exemplo o ácido láctico, diminuindo assim o pH e aumentando o efeito bacteriostático dos ácidos orgânicos em relação aos patógenos, a produção de espécies reativas de oxigênio, como o peróxido de hidrogênio, que são altamente reativos e aumentam o estresse oxidativo para patógenos em microambientes, óxido nítrico e bacteriocinas (que são pequenos peptídeos microbianos com atividade bacteriostática ou bactericida), e estes podem aumentar sua capacidade de competir contra outros microrganismos gastrointestinais e podem inibir bactérias patogênicas (ATASSI; SERVIN, 2010).

Alguns indivíduos podem vivenciar efeitos colaterais relacionados à ingestão dos probióticos devido à morte dos patógenos no ambiente intestinal, visto que eles liberam produtos celulares tóxicos ("*die-off reaction*"). Nesses casos, deve-se persistir no uso dos probióticos para que haja melhora dos sintomas. Percebe-se aumento discreto na produção de gases, desconforto abdominal e até mesmo, em raríssimas vezes, diarreia, que resolve com o tempo (DELCENSERIE et al., 2008; FOOKS; GIBSON, 2002; GUARNER, et al., 2017).

### 1.3.1 *Bacillus coagulans*

Entre as espécies probióticas de *Bacillus* a *Bacillus coagulans* vem sendo estudada há muito tempo. Em 1915, Hammer isolou *B. coagulans* do leite em lata que estava estragado. Como um tipo de bactéria produtora de ácido láctico, em 1933 algumas cepas de *B. coagulans* foram erroneamente rotuladas como *Lactobacillus sporogenes* por Horowitz-Wlassowa e Nowotelnow e posteriormente, foi classificado como *B. coagulans* (DUTTA et al., 2011; KARRI et al., 2016).

Existem duas formas básicas de micro-organismos probióticos usados em alimentos: a forma vegetativa e a forma de esporo. A forma vegetativa é mais

suscetível a altas temperaturas, umidade, acidez, vida útil de alimentos e condições ambientais negativas durante a fabricação de alimentos do que a forma de esporo.

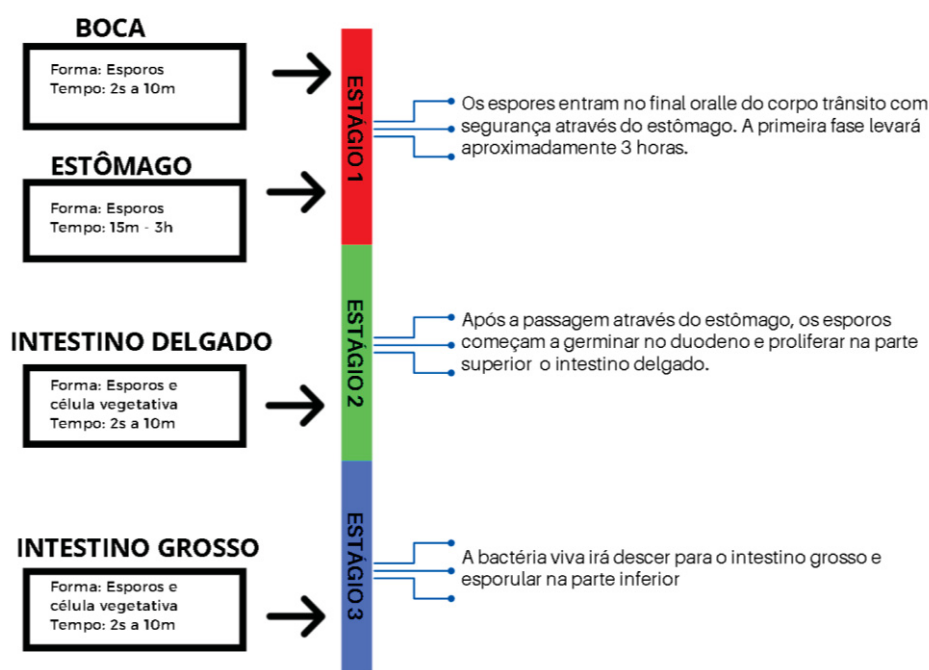
*Bacillus coagulans* é uma bactéria Gram-positiva, anaeróbia facultativa, não patogênica, formadora de esporos e produtora de ácido láctico. Algumas cepas de *Bacillus coagulans* são capazes de sobreviver a extremos de calor, onde a temperatura ótima de crescimento para *B. coagulans* é de 35 a 50 °C, a acidez do estômago e ácidos biliares, embora, em geral, as cepas dessa espécie sejam bastante heterogêneas o pH ótimo de crescimento é de 5,5 a 6,5 (ARA et al., 2003; AŞAN, 2010; CLERCK et al., 2004; DRAGO; VECCHI, 2009; HÉBUTERNE et al., 2000; KARRI et al., 2016; PATEL et al., 2006).

Estirpes com essas qualidades têm uma chance maior de sobrevivência através do trato gastrointestinal, permitindo assim a população transitória dos intestinos delgado e grosso por *B. coagulans*. Quando administrados por via oral, *B. coagulans* também mostraram efeitos benéficos no ambiente intestinal, frequência e características das fezes e atributos dérmicos em animais e humanos. Em comparação com os probióticos comerciais tradicionais, o *B. coagulans* tem maior probabilidade de exercer seu papel probiótico no trato intestinal do que os probióticos vivos tradicionais devido à sua capacidade de produzir esporos. Além de que, pode sobreviver no estômago na forma de esporos e germinar no intestino, exercendo assim seu efeito probiótico (ADAMI; CAVAZZONI, 1999; ARA et al., 2003; DONSKEY et al., 2001).

Os esporos de cepas de *Bacillus* podem sobreviver por anos em seu estado dormente, mas se receberem o estímulo adequado, eles podem germinar rapidamente (SETLOW, 2014). Com base em alguns estudos, construiu-se um ciclo de vida de germinação de esporos em humanos que provavelmente é adequado para a maioria das cepas de *B. coagulans*, no estágio 1, os esporos entram no corpo por via oral e transitam com segurança para o estômago (Figura 3). A mastigação é a primeira etapa e tem importante influência no processo digestivo geral, principalmente na taxa de esvaziamento gástrico. Após a degradação mecânica e enzimática na boca, os esporos são transportados através do esôfago para o estômago por peristalse. A presença de sucos gástricos e bile no estômago dificultam a germinação do esporo de *B. coagulans* (BERNARDEAU et al., 2017; FAKHRY et al., 2010; GUERRA et al., 2012; KELLER et al., 2019; MINEKUS et al., 1995; SPINOSA et al., 2000; WODA et al., 2010).

Em um adulto, a primeira fase levará aproximadamente três horas. No estágio 2, após passar pelo estômago, os esporos começam a germinar no duodeno e proliferar na parte superior do intestino delgado. Um ambiente rico em nutrientes com baixo estresse microbiano é um fator importante na germinação de esporos. Normalmente, o tempo de residência de *B. coagulans* no intestino delgado varia de 2 a 5 h. Por último, no estágio 3, o *B. coagulans* vivo vai descer para o intestino grosso e esporular na parte inferior do cólon. A chance de germinação no intestino grosso é muito baixa devido ao ambiente deficiente em nutrientes e ao aumento da sensibilidade das células vegetativas na fase exponencial (BERNARDEAU et al., 2017; CASULA; CUTTING, 2002; TAM et al., 2006).

Figura 3 - Ciclo de vida de *B. coagulans* no trato digestivo humano



Fonte: Adaptado de CAO et al. (2020).

Além de apoiar os efeitos clinicamente benéficos dos microrganismos probióticos na saúde, a formulação de produtos alimentícios probióticos tem grande importância para consumidores, indústria e centros de pesquisa interessados no assunto. A resistência ao calor do probiótico *Bacillus spp.* em formas de esporos podem fornecer uma vantagem para alimentos probióticos tratados com calor. Além disso, *B. coagulans* está atraindo interesse devido à sua resistência a ácido gástrico sendo mais resistente a antibióticos do que outras Bactéria ácido láctica (BAL) (KONURAY, 2018).

#### 1.4 CAMU-CAMU

A região amazônica se destaca por suas riquezas naturais, sendo considerada a maior fonte de diversidade botânica da zona tropical. Sua extensão cobre desde o Brasil, Bolívia, Colômbia, Equador, Peru e Venezuela (VILLACHICA, 1996). Alguns frutos desta região fazem parte do consumo diário dos moradores devido às suas capacidades nutricionais e propriedades benéficas, um exemplo de interesse é o fruto camu-camu, proveniente da camucamuzeira (*Myrciaria dubia* (H.B.K.) McVaugh) caracterizada principalmente pela sua adaptabilidade ao excesso de umidade e água no solo, sendo encontrada principalmente em solos alagados próximos a corpos de água (RODRIGUES, 2001).

O camucamuzeiro pode se adaptar facilmente a diferentes condições edafoclimáticas, desde secos oxissolos até planícies de inundação e solos arenosos, porém com impacto direto em sua produção. Essa adaptação aos solos tem sido essencial para programas de *upscale* de cultivo do camu-camu principalmente no Peru (CASTRO, 2018).

É uma fruteira arbustiva da família Myrtaceae, popularmente conhecida como camu-camu, apresenta um importante interesse econômico, relacionado ao alto teor de vitamina C em seus frutos, parecidos com cereja, que está na faixa de 877 a 3.133 mg por 100 g de polpa e grandes quantidades de compostos fenólicos, classificando-o como um alimento funcional. A indústria farmacêutica tem obtido o extrato seco da polpa com a finalidade de incorporá-lo em diversas formulações fitoterápicas (ALVES et al., 2002; AKTER et al., 2011; CASTRO, 2018; FUJITA, 2015; PINEDO et al., 2004; RUFINO et al., 2011).

O fruto é uma baga esférica de superfície lisa e brilhante, de cor vermelho-arroxeadada, com dois a quatro centímetros de diâmetro, contendo de uma a quatro sementes (Figura 4). O fruto é muito apreciado para a confecção de sorvetes, sucos e licores, apresentando um grande potencial econômico (VILLACHICA, 1996). Porém para consumo *in natura* o mesocarpo é ácido e a casca é suculenta, porém, muito azeda (GRIGIO et al., 2017; NERI-NUMA et al., 2018).

Figura 4 - Fruto de *Myrciaria dubia* (A)

Fonte: Rosa, 2013.

Fruto com semente (B)



Fonte: Ventura, 2015.

O perfil fitoquímico do camu-camu revela a presença de várias substâncias bioativas. A ANVISA (Agência Nacional de Vigilância Sanitária) define substância bioativa como uma substância nutriente ou não nutriente consumida normalmente como componente de um alimento, que possui ação metabólica ou fisiológica específica no organismo humano (ANVISA, 2018). Os membros da família Myrtaceae são conhecidos devido ao grande potencial biotecnológico de suas espécies nativas e de seus frutos, tendo a possibilidade de industrialização.

O potencial antioxidante do fruto de camu-camu está atribuído ao seu alto teor de ácido ascórbico, e também à presença de compostos fenólicos em sua casca e sementes (CHIRINOS, et al., 2010). Em relação ao estudo fitoquímico, há relatos do isolamento de flavan-3-ol, ácido elágico e gálico, catequina, kaempferol, quercetina, rutina, cianidina-3-glucosídeo, delphinidina-3-glucosídeo (Figura 5), entre outros (CHIRINOS et al., 2010; FRACASSETTI et al., 2013; BATAGLION et al., 2015).

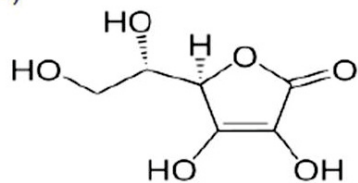
Estudos destacam ainda outros compostos importantes do camu-camu para a saúde humana, como o  $\beta$ -caroteno e a presença de minerais essenciais, como cálcio e potássio, que é responsável por acelerar a absorção intestinal de vitamina C (RIBEIRO et al., 2016; YUYAMA; AGUILAR; VALENTE, 2011; ZANATTA; MERCADANTE, 2007).

De acordo com Albertino et al. (2009), a fruta fornece trinta vezes mais ácido ascórbico que laranjas, além de apresentar aminoácidos e minerais, que servem de complemento para a absorção de vitaminas

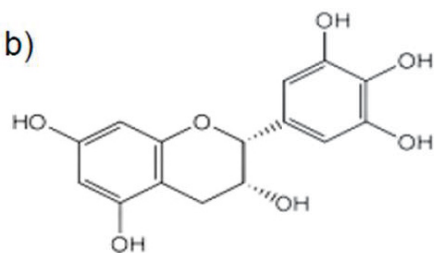
A indústria farmacêutica tem obtido o extrato seco da polpa com a finalidade de incorporá-lo em diversas formulações fitoterápicas (ALVES et al., 2002; FUJITA, 2015).

Figura 5 - Substâncias isoladas do camu-camu, (a) ácido ascórbico, (b) flavan-3-ol, (c) ácido elágico, (d) ácido gálico, (e) catequina, (f) kaempferol, (g) quercetina, (h) rutina, (i) cianidina-3-glucosídeo, (j) delphinidina-3-glucosídeo

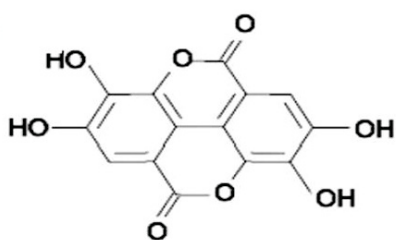
a)



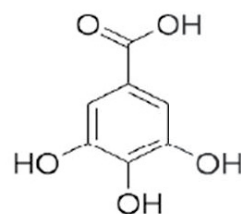
b)



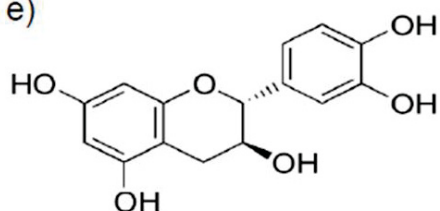
c)



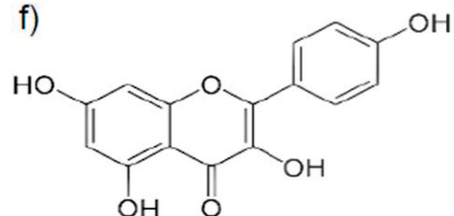
d)



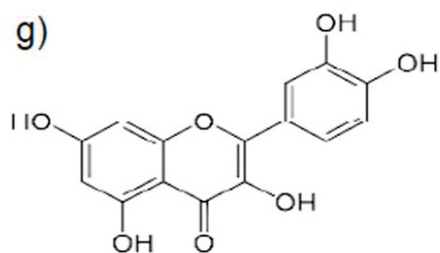
e)



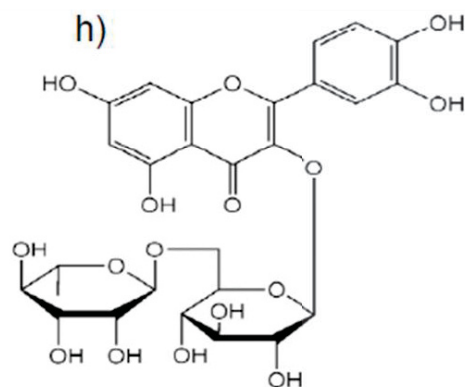
f)



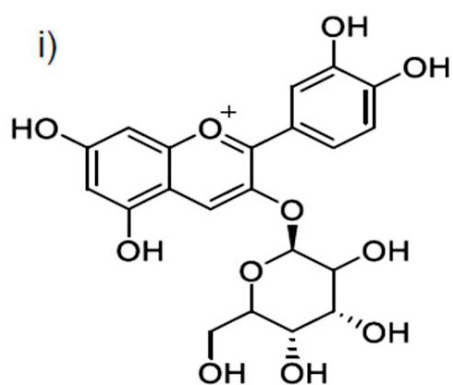
g)



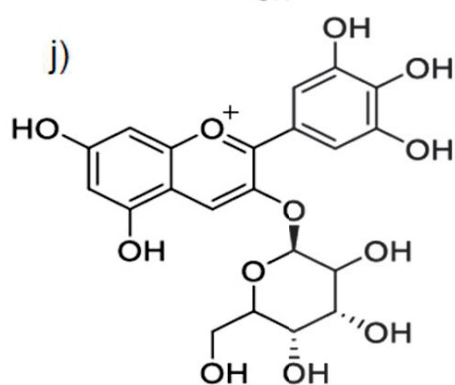
h)



i)



j)



Os antioxidantes naturais, denominados de polifenóis ou compostos fenólicos, apresentam inúmeras funções na planta, como defesa contra herbívoros, insetos, fungos, vírus e bactérias, atração de polinizadores e animais dispersores de sementes, como agentes alelopáticos e proteção dos vegetais contra a luz UV e visível, estes compostos são em muitos casos também responsáveis por proporcionar a coloração às plantas (DEL RIO et al., 2013).

Grande parte dos compostos fenólicos contidos nas frutas e vegetais estão nas formas solúvel e insolúvel. Muitos fatores influenciam a estabilidade dos compostos fenólicos nas frutas e vegetais desde a coleta, armazenamento e processamento do alimento e o seu potencial bioativo está relacionado com a absorção desses compostos durante o metabolismo (FRACASSETTI et al., 2013).

Já é reconhecida a relação entre a ingestão de frutos e vegetais e a diminuição do risco de desenvolvimento de diversas doenças crônico-degenerativas mediadas pela ação de radicais livres. O camu-camu contém grande concentração de compostos bioativos que possuem como função, a ação contra esses radicais (YAHIA, 2010).

De acordo com Azevedo et al. (2019), o extrato bruto de camu-camu, sem purificação, representa uma mistura complexa de polifenóis, que desempenha efeitos sinérgicos em efeitos antimutagênicos *in vivo*. Além disso, nos ensaios realizados, os grupos de tratamento com três concentrações de camu-camu (17, 85 e 170 mg/kg de massa corporal) não apresentaram nenhum tipo de efeito genotóxico ou mutagênico em comparação com controles negativos. Os resultados obtidos indicaram que extratos de casca e polpa de camu-camu demonstram efeito protetor nos primeiros estágios de mutação, protegendo as células de lesões primárias no DNA (genotoxicidade), tais como quebras nas cadeias e/ou locais lábeis em álcalis. No mesmo estudo, os autores constataram que os extratos de camu-camu diminuíram o estresse oxidativo *in vivo* e protegeram contra os efeitos mutagênicos de drogas na medula óssea e em micronúcleos do intestino, os quais são capazes de prever o risco de câncer.

Segundo Langley et al. (2015), a farinha produzida de resíduos de sementes e cascas de camu-camu apresenta maior atividade antioxidante quando comparado com a polpa em pó. Foi possível constatar que o fruto inteiro pode contribuir não somente para o gerenciamento de condições inflamatórias e boa saúde em geral, como também demonstrar ação potencial antiobesidade, efeito protetor na lesão

hepática e potencial para a redução do risco de doenças relacionadas ao sistema imunológico.

Alimentos funcionais com propriedades antioxidantes estão em evidência no mercado brasileiro e internacional e, elucidar o potencial bioativo de frutas brasileiras, como o camu-camu, é interessante, assim como sua relação com a microbiota humana, visando o desenvolvimento de produtos derivados do camu-camu, agregando valor aos mesmos (FILHO et al., 2018; LANGLEY et al., 2015).

Estudos sobre a biodisponibilidade destes compostos concluem que a absorção e metabolismo dos mesmos é dependente da microbiota intestinal, ressaltando que apesar do mecanismo de ação não estar completamente elucidado, resultados pré-clínicos indica que os polifenóis oriundos da dieta apresentam atividades prebióticas e favorecem o desenvolvimento da microbiota não patogênica, modulando a composição e função da microbiota, impactando no quórum bacteriano, permeabilidade da membrana e ainda a suscetibilidade das bactérias aos xenobióticos (SINGH et al., 2019).

A concentração de compostos polifenólicos detectados na urina, varia de composto a composto, segundo estudos de biodisponibilidade em humanos. Em torno de 75 a 99% do total ingerido não são detectados na urina, logo, são os metabólitos colônicos que são absorvidos, distribuídos e posteriormente excretados (SCALBERT; MANACH; MORAND, 2005).

Boto-Ordóñez et al. (2014), observaram o estímulo da colonização intestinal por bactérias benéficas em resposta ao uso de metabólitos de antocianinas. Pereira et al. (2016), fizeram um estudo avaliando as bactérias do queijo *Petit Suisse* na presença do extrato da casca de jabuticaba. A utilização do extrato provocou redução na contagem de *Lactobacillus acidophilus* sem afetar a contagem de *Bifidobacterium lactis*, podendo ser uma alternativa para a redução do estresse oxidativo deste produto mantendo os micro-organismos desejáveis (PEREIRA et al., 2016).

Neste contexto, tem-se estudado os efeitos benéficos dos polifenóis presentes no camu-camu e a modulação da microbiota intestinal. Segundo Anê et al. (2019), o camu-camu previne o depósito de gordura visceral e hepática, ativa e aumenta o gasto energético do tecido adiposo marrom sendo que todas estas atividades são microbiota dependentes e correlacionadas com alterações no “pool” e composição dos ácidos biliares.

Assim sendo, o desenvolvimento de alimentos ricos em antioxidantes extraídos de frutos nativos, em especial de subprodutos agroindustriais, representa uma tendência tecnológica que deve ser mais investigada (GRANATO et al., 2017). Enriquecer alimentos utilizando antioxidantes é uma maneira de aumentar a ingestão dos mesmos na dieta alimentar. No entanto, antioxidantes, quando sintéticos, podem apresentar toxicidade, além de exigirem elevados custos de fabricação. Por isso, a substituição por antioxidantes naturais implica em benefícios à saúde (SOONG; BARLOW, 2004).

### 1.5 SUPLEMENTOS ALIMENTARES

A demanda dos consumidores por produtos alimentares saudáveis que previnem doenças aumentou no início do século XXI (GUERIN et al., 2017). Estes modernos consumidores esperam que seus produtos alimentícios melhorem sua saúde, os alimentos que promovem a saúde além da nutrição básica são definidos como "alimentos funcionais" (MARINO et al., 2017).

O conceito de alimentos funcionais inclui alimentos ou ingredientes alimentares que contêm: probióticos, prebióticos e simbióticos, ou compostos bioativos, como antioxidantes, minerais, vitaminas e peptídeos ativos (MATEJČEKOVÁ; LIPTÁKOVÁ; VALÍK, 2017).

Pessoas que adotam estilos de vida ativos tendem a buscar os benefícios da dieta e de suplementos nutricionais que podem melhorar o bem-estar físico. Muitos estão familiarizados com proteínas de soro de leite e suplementos de aminoácidos e seu papel sugerido no aumento da massa muscular em conjunto com o treinamento apropriado.

A alimentação é fator primordial tanto na prevenção de doenças quanto na promoção da saúde humana, o que possibilita o controle de várias Doenças Crônicas Não Transmissíveis (DCNTs), como diabetes, hipertensão, neoplasias e insuficiência cardíaca. O papel da alimentação equilibrada na manutenção da saúde e na prevenção de doenças vem despertando o interesse da comunidade científica (RAIZEL et al., 2011).

Isso aumentou a demanda por alimentos promotores de saúde e bem-estar com propriedades funcionais (MARTINS et al., 2013), colaborando, assim, para o desenvolvimento de novos produtos enriquecidos com componentes fisiologicamente

ativos (ALVES et al., 2008). Neste contexto, surgem os suplementos alimentares, que são preparações destinadas a fornecer nutrientes bioativos como proteínas, aminoácidos, fibras, vitaminas, minerais e ácidos graxos, visando atender a demanda destes no organismo (BACURAU, 2007). No mercado, existem variadas formulações de suplementos alimentares, porém, não é comum encontrar suplementos alimentares com incorporação de prebióticos e probióticos.

Os eventos ligados ao desequilíbrio no estado nutricional, má nutrição e implicação destes no sistema imunológico, estão bem caracterizados na literatura científica, e estes componentes possuem ligação íntima na integridade da resposta imunológica devido ao déficit energético e indisponibilidade de micronutrientes essenciais, que podem ser rapidamente afetados por alterações no estado nutricional (FRANÇA et al., 2009).

Uma dessas implicações pode ser a desnutrição, sendo uma comorbidade frequente em pacientes com câncer avançado, afetando cerca de 40 a 80%, pacientes que se encontram internados ou acamados, ou com doenças graves que requerem intervenções multidisciplinares são ou estarão desnutridos, onde as causas se relacionam com as alterações metabólicas do tumor, efeitos locais da doença, fatores psicossociais, efeitos adversos dos tratamentos e inadequada ingestão alimentar (LORTON et al., 2020; RAVASCO, 2019).

Entretanto, o alcance do equilíbrio nutricional e a consequente homeostasia metabólica do organismo ainda são um grande desafio, diante de questões multifatoriais extrínsecas, como problemas sócio econômicos, questões culturais, saneamento básico, hábitos e estilos de vida, doenças crônicas e outros fatores que podem influenciar no acesso a uma alimentação adequada, e isto pode acarretar em consequências metabólicas onde o equilíbrio tende a não ser atingido. As consequências deste desequilíbrio podem ter extrema magnitude na resposta imunológica, uma vez que órgãos e tecidos produtores de células do sistema imunológico, imunoglobulinas, sistema complemento, microbioma intestinal, defensinas e outras substâncias que participam da resposta imunológica, são diretamente afetados, levando o sistema à imunossupressão (ALWARAWRAH; KIERNAN; MACIVER, 2018).

O estado nutricional e a relação com as funções imunológicas também foram explorados por Sayarlioglu et al. (2006), com pacientes em hemodiálise. Estes pacientes apresentam quadros de subnutrição, ocasionada pela carência de

nutrientes essenciais, o que levaria ao desenvolvimento de quadros respiratórios relacionados a mau funcionamento do sistema imunológico e consequente diminuição na produção de células do sistema imune e componentes que atuam no sistema de defesa do organismo. É indiscutível que a deficiência ou inadequação nutricional pode prejudicar as funções imunológicas.

É de conhecimento global que o estado nutricional interfere diretamente na resposta imunológica, sendo que em populações onde, em sua alimentação, são observadas carências nutricionais, há uma maior incidência de desenvolvimento de diversas patologias, e o processo de recuperação da doença tende a ser mais longo (CHANDRA; SARCHIELLI, 1993). Neste contexto, o uso de suplementos alimentares como complemento da alimentação pode trazer benefícios em relação à resposta imunológica, reduzindo o poder de infecção de determinados patógenos, ou mesmo acelerando o processo de recuperação do indivíduo (OZ, 2017).

No Brasil, os suplementos alimentares são definidos pela Resolução da Agência Nacional de Vigilância Sanitária - ANVISA nº 243/2018 como "produto para ingestão oral, apresentado em formas farmacêuticas, destinado a suplementar a alimentação de indivíduos saudáveis com nutrientes, substâncias bioativas, enzimas ou probióticos isolados ou combinados", não podendo conter em seus rótulos alegações/finalidade medicamentosa ou terapêutica, seja ela preventiva, paliativa ou curativa. Tais componentes devem fazer parte de uma estratégia que visa atender às necessidades de saúde do indivíduo, e sua utilização deve servir de recurso complementar, no contexto de um estilo de vida saudável (dieta, atividade física, saúde mental, bem-estar social) (ANVISA, 2018).

De acordo com esta Resolução, se enquadram nesta definição suplementos de vitaminas e minerais, substâncias bioativas e probióticos, novos alimentos, alimentos com alegação de propriedade funcional, suplementos para atletas e complementos alimentares para gestantes e nutrízes. Os valores mínimos e máximos de utilização dos compostos, na recomendação diária de consumo e por grupo populacional indicado pelo fabricante, bem como as alegações de uso dos compostos, cuja segurança fora comprovada, estão descritos na Instrução Normativa IN nº 76 de 2020 (ANVISA, 2020), essa normativa, veio para atualizar a IN nº 28 de 2018.

É importante salientar que, em outros países, os termos "suplemento" ou "nutracêutico", são utilizados para compostos que não se aplicam à legislação brasileira vigente, sendo estes, muitas vezes, classificados aqui como medicamentos

isentos de prescrição (MIPs), ou medicamentos fitoterápicos. Ainda não há, na literatura científica, um consenso ou recomendação do uso de nutrientes ou compostos bioativos, em doses permitidas em suplementos alimentares no Brasil, com desfecho benéfico que represente redução da carga viral em infecções, aumento da resposta imunológica ou mesmo como prevenção de afecções virais agudas ou crônicas (ANVISA, 2020).

A legislação vigente para requisitos sanitários para suplementos alimentares (RDC nº 243/2018 e IN nº 76/2020), permite a alegação de uso em rótulos dos produtos classificados como “auxiliares no funcionamento do sistema imune”. Dentre todos os compostos destacados na legislação, os que possuem tal alegação de uso são o ácido fólico, vitamina A, vitamina B12, vitamina B6, vitamina C, vitamina D, cobre, ferro, selênio e zinco, com seus limites máximos de recomendação diária como suplementos alimentares, mas não atribui propriedade terapêutica ou medicamentosa a estes compostos (ANVISA, 2020).

Com base no conhecimento teórico, sabe-se que a intervenção nutricional precoce com alta ingestão de proteínas, nutrientes essenciais e a utilização de probióticos com propriedades promotoras da saúde e no microbioma intestinal, pode resultar em melhor estado nutricional e qualidade de vida, bem como uma melhor tolerância ao tratamento, portanto, considerando as potencialidades do camu-camu e do probiótico *Bacillus coagulans* na elaboração de alimentos com benefícios de saúde,

Esta pesquisa tem como objetivo apresentar uma proposta de uma formulação de um suplemento alimentar a base de Whey Protein, enriquecido com camu-camu e cepa de microrganismo probiótico *Bacillus coagulans*.

## REFERÊNCIAS

- ADAMI, A.; CAVAZZONI, V. Occurrence of selected bacterial groups in the faeces of piglets fed with *Bacillus coagulans* as probiotic. **Journal Of Basic Microbiology**, [S.l.], v. 39, n. 1, p. 3-9, mar. 1999. Wiley. [http://dx.doi.org/10.1002/\(sici\)1521-4028\(199903\)39:13.0.co;2-o](http://dx.doi.org/10.1002/(sici)1521-4028(199903)39:13.0.co;2-o).
- AGUIAR, C. L.; CORÓ, F.A.G.; PEDRÃO, M.R. Componentes ativos de origem animal. **Boletim do Centro de Pesquisa de Processamento de Alimentos**. [S.l.], 2005. Disponível em: <https://revistas.ufpr.br/alimentos/article/view/4476/3499>. Acesso em: 27 nov. 2021.
- AKTER, M. S.; OH, S.; EUN, J.; AHMED, M. Nutritional compositions and health promoting phytochemicals of camu-camu (*myrciaria dubia*) fruit: a review. **Food Research International**, [S.l.], v. 44, n. 7, p. 1728-1732, ago. 2011. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodres.2011.03.045>.
- ALBERTINO, A.; BARGE, A.; CRAVOTTO, G.; GENZINI, L.; GOBETTO, R.; VINCENTI, M. Natural origin of ascorbic acid: validation by <sup>13</sup>c nmr and irms. **Food Chemistry**, [S.l.], v. 112, n. 3, p. 715-720, fev. 2009. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2008.05.114>.
- ALVES, L. L.; MATTANNA, P.; BECKER, L. V.; RICHARDS, N. S. P. S.; ANDRADE, D. F. Avaliação sensorial de cream cheeses potencialmente simbióticos utilizando a metodologia de superfície de resposta. **Alimentos e Nutrição Araraquara, Araraquara**, v. 4, n. 19, p. 409-416. 2008. Trimestral. Disponível em: <http://serv-bib.fcfar.unesp.br/seer/index.php/alimentos/article/view/649/545>. Acesso em: 27 nov. 2021.
- ALVES, R. E., FILGUEIRAS, H. A. C., MOURA, C. F. H., ARAÚJO, N. C. C., ALMEIDA, A. S. Camu-Camu (*Myrciaria dubia* Mc Vaugh): a rich natural source of vitamin C. **Proceedings of the Interamerican Society for Tropical Horticulture**, Leuven, Belgium, v. 46, n. 1, p. 11-13, 2002.
- ALVES, R. E.; ALMEIDA, H.; FILGUEIRAS, C.; FARLEY, C.; MOURA, H.; ARAÚJO, C. C.; ALMEIDA, A. S. Camu-camu (*Myrciaria dubia* Mc Vaugh): A rich natural source of vitamin C. **Proceedings of the Interamerican Society for Tropical Horticulture**, San Jose, v.46, p.11-13, 2002.
- ALWARAWRAH, Y.; KIERNAN, K.; MACIVER, N. J. Changes in Nutritional Status Impact Immune Cell Metabolism and Function. **Frontiers In Immunology**, [S.l.], v. 9, p. 1-14, 16 maio 2018. Frontiers Media SA. <http://dx.doi.org/10.3389/fimmu.2018.01055>.
- ANHÊ, F. F.; NACHBAR, R. T.; VARIN, T. V.; TROTTIER, J.; DUDONNÉ, S.; BARZ, M. L.; FEUTRY, P.; PILON, G.; BARBIER, O.; DESJARDINS, Y. Treatment with camu camu (*Myrciaria dubia*) prevents obesity by altering the gut microbiota and increasing energy expenditure in diet-induced obese mice. **Gut**, [S.l.], v. 68, n. 3, p. 453-464, 31 jul. 2018. BMJ. <http://dx.doi.org/10.1136/gutjnl-2017-315565>.

ANON. **Reference Manual for U.S.** Whey Products, Arlington, VA,: U.S. Dairy Export Council, 1997.

ANTUNES, Aloísio José. **Funcionalidade de Proteínas do Soro de Leite Bovino.** São Paulo: Manole, 2003. Disponível em: <https://books.google.com.br/books?hl=pt-BR&lr=&id=1ralw30CqEwC&oi=fnd&pg=PA9&dq=soro+de+leite&ots=Kwos9pQKql&sig=7XIP4VKxkMTCJziVie68qD0Mg0U#v=onepage&q&f=false>. Acesso em: 8 ago. 2021.

ANVISA. AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. **Instrução Normativa nº 28 de 26 de julho de 2018.** Estabelece as listas de constituintes, de limites de uso, de alegações e de rotulagem complementar dos suplementos alimentares.

ANVISA. AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. **Instrução Normativa nº 76, de 05 de novembro de 2020.** Dispõe sobre a atualização das listas de constituintes, de limites de uso, de alegações e de rotulagem complementar dos suplementos alimentares.

ANVISA. AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. **Instrução Normativa nº 94, de 18 de setembro de 2020.** Aprova o regulamento técnico que fixa os Padrões de Identidade e qualidade para o soro de leite e o soro de leite ácido.

ANVISA. AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. **Resolução da Diretoria Colegiada - RDC nº 239, de 26 de julho de 2018.** Estabelece os aditivos alimentares e coadjuvantes de tecnologia autorizados para uso em suplementos alimentares.

ANVISA. AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. **Resolução da Diretoria Colegiada – RDC nº 241, de 26 de julho de 2018.** Dispõe sobre os requisitos para comprovação da segurança e dos benefícios à saúde dos probióticos para uso em alimentos.

ANVISA. AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. **Resolução RDC nº 243 de 26 de julho de 2018.** Dispõe sobre os requisitos sanitários dos suplementos alimentares.

ARA, K.; MEGURO, S.; HASE, T.; TOKIMITSU, I.; OTSUJI, K.; KAWAI, S.; ITO, S.; IINO, H. Effect of Spore-bearing Lactic Acid-forming Bacteria (*Bacillus coagulans* SANK 70258) Administration on the Intestinal Environment, Defecation Frequency, Fecal Characteristics and Dermal Characteristics in Humans and Rats. **Microbial Ecology In Health And Disease**, [S.l.], v. 14, n. 1, p. 4-13, jan. 2002. Informa UK Limited. <http://dx.doi.org/10.1080/089106002760002694>.

AŞAN ÖZÜSAĞLAM, M. **Importance of *Bacillus coagulans* Bacterium as Probiotic in Animal Nutrition.** *Süleyman Demirel Üniv. Ziraat Fak. Derg.* 2010.

ATASSI, F.; SERVIN, A. L. Individual and co-operative roles of lactic acid and hydrogen peroxide in the killing activity of enteric strain *Lactobacillus johnsonii* NCC933 and vaginal strain *Lactobacillus gasseri* KS120.1 against enteric,

uropathogenic and vaginosis-associated pathog. **Fems Microbiology Letters**, [S.I.], v. 304, n. 1, p. 29-38, 4 fev. 2010. Oxford University Press (OUP). <http://dx.doi.org/10.1111/j.1574-6968.2009.01887.x>.

AVELLO, Marcia; SUWALSKY, Mario. Radicais livres, antioxidantes naturais e mecanismos de proteção. **Athena (Concepc.)**, Concepción, n. 494, pág. 161-172, 2006. Disponível em: [http://www.scielo.cl/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0718-04622006000200010&lng=es&nrm=iso](http://www.scielo.cl/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0718-04622006000200010&lng=es&nrm=iso). Acesso em: 27 nov. 2021. <http://dx.doi.org/10.4067/S0718-04622006000200010>.

AZEVEDO, L.; RIBEIRO, P. F. A.; OLIVEIRA, J. A. C.; CORREIA, M. G.; RAMOS, F. M.; OLIVEIRA, E. B.; BARROS, F.; STRINGHETA, P. C. Camu-camu (*Myrciaria dubia*) from commercial cultivation has higher levels of bioactive compounds than native cultivation (Amazon Forest) and presents antimutagenic effects in vivo. **Journal Of The Science Of Food And Agriculture**, [S.I.], v. 99, n. 2, p. 624-631, 2 ago. 2018. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1002/jsfa.9224>.

BACURAU, R. F. **Nutrição e Suplementação Desportiva**. 5. ed. São Paulo: Phorte. 2007.

BALLATORI, N.; KRANCE, S. M.; NOTENBOOM, S.; SHI, S.; TIEU, K.; HAMMOND, C. L. Glutathione dysregulation and the etiology and progression of human diseases. **Biological Chemistry**, [S.I.], v. 390, n. 3, p. 191-214, 1 mar. 2009. Walter de Gruyter GmbH. <http://dx.doi.org/10.1515/bc.2009.033>.

BATAGLION, G. A.; SILVA, F. M. A. da; EBERLIN, M. N.; KOOLEN, H. H. F. Determination of the phenolic composition from Brazilian tropical fruits by UHPLC–MS/MS. **Food Chemistry**, [S.I.], v. 180, p. 280-287, ago. 2015. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2015.02.059>.

BEDANI, R.; ROSSI, E. A. Microbiota intestinal e probióticos: Implicações sobre o câncer de cólon. **Jornal Português de Gastreenterologia**, Lisboa, v. 16, p. 19-28, 2009.

BENEVIDES, L. A; VEIGA, A. Aspectos históricos, fisiológicos e antroposóficos do leite na alimentação humana: uma introdução ao tema. **Arte Médica Ampliada**, v. 34, n. 1, p. 5-12, 2014.

BENGMARK, S.; GIL, Á. Control bioecológico y nutricional de la enfermedad: prebióticos, probióticos y simbióticos. **Nutr. Hosp.**, Madrid, v. 21, supl. 2, p. 73-86, mayo 2006. Disponível em: [http://scielo.isciii.es/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0212-16112006000500008&lng=es&nrm=iso](http://scielo.isciii.es/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0212-16112006000500008&lng=es&nrm=iso). Acesso em: 27 nov. 2021.

BERNARDEAU, M.; LEHTINEN, M. J.; FORSSTEN, S. D.; NURMINEN, P. Importance of the gastrointestinal life cycle of *Bacillus* for probiotic functionality. **Journal Of Food Science And Technology**, [S.I.], v. 54, n. 8, p. 2570-2584, 23 maio 2017. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1007/s13197-017-2688-3>.

BOTO-ORDÓÑEZ, M.; URPI-SARDA, M.; QUEIPO-ORTUÑO, M. I.; TULIPANI, S.; TINAHONES, F. J.; ANDRES-LACUEVA, C. High levels of Bifidobacteria are associated with increased levels of anthocyanin microbial metabolites: a randomized clinical trial. **Food Funct.**, [S.l.], v. 5, n. 8, p. 1932-1938, 2014. Royal Society of Chemistry (RSC). <http://dx.doi.org/10.1039/c4fo00029c>.

BOUNOUS G. Whey protein concentrate (WPC) and glutathione modulation in cancer treatment. **Anticancer Res.** 2000 Nov-Dec. 4785-4792.

BUMRUNGPET, A.; PAVADHGUL, P.; NUNTHANAWANICH, P.; SIRIKANCHANAROD, A.; ADULBHAN, A. Whey Protein Supplementation Improves Nutritional Status, Glutathione Levels, and Immune Function in Cancer Patients: a randomized, double-blind controlled trial. **Journal Of Medicinal Food**, [S.l.], v. 21, n. 6, p. 612-616, jun. 2018. Mary Ann Liebert Inc. <http://dx.doi.org/10.1089/jmf.2017.4080>.

CANO, F. C. S. **Análise dos circuitos espaciais de produção e dos círculos de cooperação na produção de suplementos alimentares: whey protein.** 2017. 66 f. Trabalho de conclusão de curso (bacharelado - Geografia) - Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, Instituto de Geociências e Ciências Exatas, 2017. Disponível em: <http://hdl.handle.net/11449/156813>. Acesso em: 27 nov. 2021.

CAO, J.; YU, Z.; LIU, W.; ZHAO, J.; ZHANG, H.; ZHAI, Q.; CHEN, W. Probiotic characteristics of *Bacillus coagulans* and associated implications for human health and diseases. **Journal Of Functional Foods**, [S.l.], v. 64, p. 103643, jan. 2020. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jff.2019.103643>.

CASTRO, J. C.; MADDIX, J. D.; IMÁN, S. A. Camu-camu— *Myrciaria dubia* (Kunth) McVaugh. **Exotic Fruits**. Elsevier. 2018. ISBN 9780128031384.

CASULA, G.; CUTTING, S. M. *Bacillus* Probiotics: spore germination in the gastrointestinal tract. *Applied And Environmental Microbiology*, [S.l.], v. 68, n. 5, p. 2344-2352, maio 2002. **American Society for Microbiology**. <http://dx.doi.org/10.1128/aem.68.5.2344-2352.2002>.

CHANDRA, R. K.; SARCHIELLI, P. Nutritional Status and Immune Responses. **Clinics In Laboratory Medicine**, [S.l.], v. 13, n. 2, p. 455-461, jun. 1993. Elsevier BV. [http://dx.doi.org/10.1016/s0272-2712\(18\)30448-7](http://dx.doi.org/10.1016/s0272-2712(18)30448-7).

CHIRINOS, R.; GALARZA, J.; BETALLELUZ-PALLARDEL, I.; PEDRESCHI, R.; CAMPOS, D. Antioxidant Compounds and Antioxidant Capacity of Peruvian Camu-camu (*Myrciaria dubia* (H.B.K.) (McVaugh) Fruit at Different Maturity Stages. **Food Chemistry**, v. 120, n. 4, jun. 2010.

CLERCK, E.; RODRIGUEZ-DIAZ, M.; FORSYTH, G.; LEBBE, L.; LOGAN, N. A.; DEVOS, P. Polyphasic Characterization of *Bacillus coagulans* Strains, Illustrating Heterogeneity within this Species, and Emended Description of the Species. **Systematic And Applied Microbiology**, [S.l.], v. 27, n. 1, p. 50-60, jan. 2004. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1078/0723-2020-00250>.

ÇOMAK GÖÇER, E. M.; ERGIN, F.; AŞCI ARSLAN, A.; KÜÇÜKÇETİN, A. **Farklı İnkübasyon Sıcaklığı ile İnkübasyon Sonlandırma pH'sının Probiyotik Yoğurdun Fizikokimyasal ve Mikrobiyolojik Özellikleri Üzerine Etkisi.** *Akademik Gıda*, c. 14, sayı. 4, ss. 341-350, Ara. 2016.

COOK, M. T.; TZORTZIS, G.; CHARALAMPOPOULOS, D.; KHUTORYANSKIY, V. V. Microencapsulation of probiotics for gastrointestinal delivery. **Journal Of Controlled Release**, [S.I.], v. 162, n. 1, p. 56-67, ago. 2012. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jconrel.2012.06.003>.

DEL RIO, D.; RODRIGUEZ-MATEOS, A.; SPENCER, J. P.; TOGNOLINI, M.; BORGES, G.; CROZIER, A. Dietary (Poly)phenolics in Human Health: structures, bioavailability, and evidence of protective effects against chronic diseases. **Antioxidants & Redox Signaling**, [S.I.], v. 18, n. 14, p. 1818-1892, 10 maio 2013. Mary Ann Liebert Inc. <http://dx.doi.org/10.1089/ars.2012.4581>.

DELCENSERIE, V.; MARTEL, D.; LAMOUREUX, M.; AMIOT, J.; BOUTIN, Y.; ROY, D. Immunomodulatory Effects of Probiotics in the Intestinal Tract. **Current Issues In Molecular Biology**, [S.I.], v. 10, p. 37-54, 2008. <http://dx.doi.org/10.21775/cimb.010.037>.

DONSKEY, C. J.; HOYEN, C. K.; DAS, S. M.; FARMER, S.; DERY, M.; BONOMO, R. A. Effect of oral *Bacillus coagulans* administration on the density of vancomycin-resistant enterococci in the stool of colonized mice. **Letters In Applied Microbiology**, [S.I.], v. 33, n. 1, p. 84-88, jul. 2001. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1046/j.1472-765x.2001.00948.x>.

DRAGO, L.; VECCHI, E. Should *Lactobacillus sporogenes* and *Bacillus coagulans* Have a future? **Journal Of Chemotherapy**, [S.I.], v. 21, n. 4, p. 371-377, ago. 2009. Informa UK Limited. <http://dx.doi.org/10.1179/joc.2009.21.4.371>.

DUTTA, P.; MITRA, U.; DUTTA, S.; RAJENDRAN, K.; SAHA, T. K.; CHATTERJEE, M. K. Randomised controlled clinical trial of *Lactobacillus sporogenes* (*Bacillus coagulans*), used as probiotic in clinical practice, on acute watery diarrhoea in children. **Tropical Medicine & International Health**, [S.I.], v. 16, n. 5, p. 555-561, 20 fev. 2011. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-3156.2011.02745.x>.

EFSA. Scientific Opinion on the update of the list of QPS-recommended biological agents intentionally added to food or feed as notified to EFSA†. **Efsa Journal**, [S.I.], v. 15, n. 3, p. 1-178, mar. 2017. Wiley. <http://dx.doi.org/10.2903/j.efsa.2017.4664>.

EMBRAPA. **Anuário Leite 2018**: indicadores, tendências e oportunidades para quem vive no setor leiteiro. 2018. 116 p. Disponível em: <https://www.embrapa.br/busca-de-publicacoes/-/publicacao/1094149/anuario-leite-2018-indicadores-tendencias-e-oportunidades-para-quem-vive-no-setor-leiteiro>. Acesso em: 27 nov. 2021.

FAKHRY, S.; SORRENTINI, I.; RICCA, E.; FELICE, M. de; BACCIGALUPI, L. Characterization of spore forming Bacilli isolated from the human gastrointestinal

tract. **Journal Of Applied Microbiology**, [S.I.], v. 105, n. 6, p. 2178-2186, dez. 2008. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-2672.2008.03934.x>.

FAO. **Probiotics in Food: Health and Nutritional Properties and Guidelines for Evaluation**. Food and Agriculture Organization of the United Nations, Rome, 2006).

FIJAN, S. Microorganisms with Claimed Probiotic Properties: an overview of recent literature. **International Journal Of Environmental Research And Public Health**, [S.I.], v. 11, n. 5, p. 4745-4767, 5 maio 2014. MDPI AG. <http://dx.doi.org/10.3390/ijerph110504745>.

FILHO, D.; MELO FILHO, A. A.; MAGALHÃES NETO, A. N.; SANTOS, R. C.; CHAGAS, E. A.; CHAGAS, P. C.; MONTEIRO, I. F.; SOUZA, R. C. P. Chemical composition, minerals, physical-chemical properties and antioxidant activity in camu camu seed oil. **Chemical Engineering Transactions**, [S.I.], v. 64, p. 325-330, maio 2018. AIDIC: Italian Association of Chemical Engineering. <http://dx.doi.org/10.3303/CET1864055>.

FLINT, H. J.; SCOTT, K. P.; LOUIS, P.; DUNCAN, S. H. The role of the gut microbiota in nutrition and health. **Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology**, [S.I.], v. 9, n. 10, p. 577-589, 4 set. 2012. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1038/nrgastro.2012.156>.

FOEGEDING, E. A.; DAVIS, J. P.; DOUCET, D.; MCGUFFEY, M. K. Advances in modifying and understanding whey protein functionality. **Trends In Food Science & Technology**, [S.I.], v. 13, n. 5, p. 151-159, maio 2002. Elsevier BV. [http://dx.doi.org/10.1016/s0924-2244\(02\)00111-5](http://dx.doi.org/10.1016/s0924-2244(02)00111-5).

FOOKS, L. J.; GIBSON, G. R. Probiotics as modulators of the gut flora. **British Journal Of Nutrition**, [S.I.], v. 88, n. 1, p. 39-49, set. 2002. Cambridge University Press (CUP). <http://dx.doi.org/10.1079/bjn2002628>.

FRACASSETTI, D.; COSTA, C.; MOULAY, L.; TOMÁS-BARBERÁN, F. A. Ellagic acid derivatives, ellagitannins, proanthocyanidins and other phenolics, vitamin C and antioxidant capacity of two powder products from camu-camu fruit (*Myrciaria dubia*). **Food Chemistry**, [S.I.], v. 139, n. 1-4, p. 578-588, ago. 2013. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2013.01.121>.

FRANÇA, T. G D.; ISHIKAWA, L. L. W.; ZORZELLA-PEZAVENTO, S. F. G.; CHIUSO-MINICUCCI, F.; CUNHA, M. L. R. S.; SARTORI, A. Impact of malnutrition on immunity and infection. **Journal Of Venomous Animals And Toxins Including Tropical Diseases**, [S.I.], v. 15, n. 3, p. 374-390, 2009. FapUNIFESP (SciELO). <http://dx.doi.org/10.1590/s1678-91992009000300003>.

FUJITA, A. **Produtos derivados do cam-camu: efeito da secagem sobre elagitaninos e flavonoides, atividade antioxidante e antimicrobiana**. 149 f. Tese (Doutorado em Bromatologia) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2015. Doi: 10.11606/T.9.2015.tde-24092015-083939.

FULLER, A. F. R. C. R. Probiotics in man and animals. **Journal Of Applied Bacteriology**, [S.I.], v. 66, n. 5, p. 365-378, maio 1989. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-2672.1989.tb05105.x>.

GIBSON, G. R.; HUTKINS, R.; SANDERS, M. E.; PRESCOTT, S. L.; REIMER, R. A.; SALMINEN, S. J.; SCOTT, K.; STANTON, C.; SWANSON, K. S.; CANI, P. D. Expert consensus document: the international scientific association for probiotics and prebiotics (isapp) consensus statement on the definition and scope of prebiotics. **Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology**, [S.I.], v. 14, n. 8, p. 491-502, 14 jun. 2017. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1038/nrgastro.2017.75>.

GILL, S. R.; POP, M.; DEBOY, R. T.; ECKBURG, P. B.; TURNBAUGH, P. J.; SAMUEL, B. S.; GORDON, J. I.; RELMAN, D. A.; FRASER-LIGGETT, C. M.; NELSON, K. E. Metagenomic Analysis of the Human Distal Gut Microbiome. *Science*, [S.I.], v. 312, n. 5778, p. 1355-1359, 2 jun. 2006. **American Association for the Advancement of Science (AAAS)**. <http://dx.doi.org/10.1126/science.1124234>.

GOHIR, W.; RATCLIFFE, E. M.; SLOBODA, D. M. Of the bugs that shape us: maternal obesity, the gut microbiome, and long-term disease risk. **Pediatric Research**, [S.I.], v. 77, n. 1-2, p. 196-204, 14 out. 2014. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1038/pr.2014.169>.

GRAF, S.; EGERT, S.; HEER, M. Effects of whey protein supplements on metabolism. **Current Opinion In Clinical Nutrition And Metabolic Care**, [S.I.], v. 14, n. 6, p. 569-580, nov. 2011. Ovid Technologies (Wolters Kluwer Health). <http://dx.doi.org/10.1097/mco.0b013e32834b89da>.

GRANATO, D.; SANTOS, J. S.; SALEM, R. D. S.; MORTAZAVIAN, A. M.; ROCHA, R. S.; CRUZ, A. G. Effects of herbal extracts on quality traits of yogurts, cheeses, fermented milks, and ice creams: a technological perspective. **Current Opinion In Food Science**, [S.I.], v. 19, p. 1-7, fev. 2018. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.cofs.2017.11.013>.

GREEN, J. M.; BARRATT, M. J.; KINCH, M.; GORDON, J. I. Food and microbiota in the FDA regulatory framework. *Science*, [S.I.], v. 357, n. 6346, p. 39-40, 7 jul. 2017. **American Association for the Advancement of Science (AAAS)**. <http://dx.doi.org/10.1126/science.aan0836>.

GRIGIO, M. L.; CHAGAS, E. A.; RATHINASABAPATHI, B.; CHAGAS, P. C.; SILVA, A. R. V.; SOBRAL, S. T. M.; OLIVEIRA, R. R. Qualitative evaluation and biocompounds present in different parts of camu-camu (*Myrciaria dubia*) fruit. **African Journal Of Food Science**, [S.I.], v. 11, n. 5, p. 124-129, 31 maio 2017. Academic Journals. <http://dx.doi.org/10.5897/ajfs2016.1574>.

GUARNER, F. (Coord.). **Diretrizes Mundiais da Organização Mundial de Gastroenterologia (WGO): prebióticos e probióticos**. 2017. 35 p. Disponível em: <https://www.worldgastroenterology.org/guidelines/probiotics-and-prebiotics/probiotics-and-prebiotics-portuguese>. Acesso em: 27 nov. 2021.

GUERIN, J.; PETIT, J.; BURGAIN, J.; BORGES, F.; BHANDARI, B.; PERROUD, C.; DESOBRY, S.; SCHER, J.; GAIANI, C. Lactobacillus rhamnosus GG encapsulation by spray-drying: milk proteins clotting control to produce innovative matrices. **Journal Of Food Engineering**, [S.I.], v. 193, p. 10-19, jan. 2017. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2016.08.008>.

GUERRA, A.; ETIENNE-MESMIN, L.; LIVRELLI, V.; DENIS, S.; BLANQUET-DIOT, S.; ALRIC, M. Relevance and challenges in modeling human gastric and small intestinal digestion. **Trends In Biotechnology**, [S.I.], v. 30, n. 11, p. 591-600, nov. 2012. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.tibtech.2012.08.001>.

GÜRSEL, A. **Peyniralti Suyu Teknologisi (Whey Protein)**. A. U. Ziraat Fak. Yayinlari, Ankara. 2015. ISBN 9786051361901.

HA, E.; ZEMEL, M. B. Functional properties of whey, whey components, and essential amino acids: mechanisms underlying health benefits for active people (review). **The Journal Of Nutritional Biochemistry**, [S.I.], v. 14, n. 5, p. 251-258, maio 2003. Elsevier BV. [http://dx.doi.org/10.1016/s0955-2863\(03\)00030-5](http://dx.doi.org/10.1016/s0955-2863(03)00030-5).

HARAGUCHI, F. K.; ABREU, W. C.; PAULA, H. Proteínas do soro do leite: composição, propriedades nutricionais, aplicações no esporte e benefícios para a saúde humana. **Revista de Nutrição**, [S.I.], v. 19, n. 4, p. 479-488, ago. 2006. FapUNIFESP (SciELO). <http://dx.doi.org/10.1590/s1415-52732006000400007>.

HÉBUTERNE, X.; LEMARIÉ, E.; MICHALLET, M.; MONTREUIL, C. B.; SCHNEIDER, S. M.; GOLDWASSER, F. Prevalence of Malnutrition and Current Use of Nutrition Support in Patients With Cancer. **Journal Of Parenteral And Enteral Nutrition**, [S.I.], v. 38, n. 2, p. 196-204, 23 jan. 2014. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1177/0148607113502674>.

HULMI, J. J.; LOCKWOOD, C. M.; STOUT, J. R. Effect of protein/essential amino acids and resistance training on skeletal muscle hypertrophy: a case for whey protein. **Nutrition & Metabolism**, [S.I.], v. 7, n. 1, p. 51, 2010. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1186/1743-7075-7-51>.

HYRONIMUS, B; MARREC, C. L.; SASSI, A. H.; DESCHAMPS, A. Acid and bile tolerance of spore-forming lactic acid bacteria. **International Journal Of Food Microbiology**, [S.I.], v. 61, n. 2-3, p. 193-197, nov. 2000. Elsevier BV. [http://dx.doi.org/10.1016/s0168-1605\(00\)00366-4](http://dx.doi.org/10.1016/s0168-1605(00)00366-4).

KARRI S. K., MAJEED M., NATARAJAN S., SIVAKUMAR A., ALI F., PANDE A., MAJEED S. Evaluation of anti-diarrhoeal activity of Bacillus coagulans MTCC 5856 and its effect on gastrointestinal motility in wistar rats. **Int. J. Pharm. Biol. Sci.** v. 7, n. 1, p. 311-316. 2016.

KATSANOS, C. S.; KOBAYASHI, H.; SHEFFIELD-MOORE, M.; AARSLAND, A.; WOLFE, R. R. A high proportion of leucine is required for optimal stimulation of the rate of muscle protein synthesis by essential amino acids in the elderly. **American Journal Of Physiology-Endocrinology And Metabolism**, [S.I.], v. 291, n. 2, p. 381-

387, ago. 2006. American Physiological Society.  
<http://dx.doi.org/10.1152/ajpendo.00488.2005>.

KELLER, D.; VERBRUGGEN, S.; CASH, H.; FARMER, S.; VENEMA, K. Spores of *Bacillus coagulans* GBI-30, 6086 show high germination, survival and enzyme activity in a dynamic, computer-controlled in vitro model of the gastrointestinal tract. **Beneficial Microbes**, [S.I.], v. 10, n. 1, p. 77-87, 8 fev. 2019. Wageningen Academic Publishers. <http://dx.doi.org/10.3920/bm2018.0037>.

KONURAY, G.; ERGINKAYA, Z. Potential Use of *Bacillus coagulans* in the Food Industry. **Foods**, [S.I.], v. 7, n. 6, p. 92, 13 jun. 2018. MDPI AG.  
<http://dx.doi.org/10.3390/foods7060092>.

KOSSEVA, M. R.; PANESAR, P. S.; KAUR, G.; KENNEDY, J. F. Use of immobilised biocatalysts in the processing of cheese whey. **International Journal Of Biological Macromolecules**, [S.I.], v. 45, n. 5, p. 437-447, dez. 2009. Elsevier BV.  
<http://dx.doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2009.09.005>.

LACROIX, M.; BOS, C.; LÉONIL, J.; AIRINEI, G.; LUENGO, C.; DARÉ, S.; BENAMOUZIG, R.; FOUILLET, H.; FAUQUANT, J.; TOMÉ, D. Compared with casein or total milk protein, digestion of milk soluble proteins is too rapid to sustain the anabolic postprandial amino acid requirement. **The American Journal Of Clinical Nutrition**, [S.I.], v. 84, n. 5, p. 1070-1079, 1 nov. 2006. Oxford University Press (OUP). <http://dx.doi.org/10.1093/ajcn/84.5.1070>.

LANCHA, A. H.; ZANELLA, R.; TANABE, S. G. O.; ANDRIAMIHAJA, M.; BLACHIER, F. Dietary protein supplementation in the elderly for limiting muscle mass loss. **Amino Acids**, [S.I.], v. 49, n. 1, p. 33-47, 2 nov. 2016. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1007/s00726-016-2355-4>.

LANGLEY, P. C.; PERGOLIZZI, J. V.; TAYLOR, R.; RIDGWAY, C. Antioxidant and Associated Capacities of Camu Camu (*Myrciaria dubia*): a systematic review. **The Journal Of Alternative And Complementary Medicine**, [S.I.], v. 21, n. 1, p. 8-14, jan. 2015. Mary Ann Liebert Inc. <http://dx.doi.org/10.1089/acm.2014.0130>.

LEBEER, S.; A BRON, P.; MARCO, M. L.; VAN PIJKEREN, J.; MOTHERWAY, M. O.; HILL, C.; POT, B.; ROOS, S.; KLAENHAMMER, T. Identification of probiotic effector molecules: present state and future perspectives. **Current Opinion In Biotechnology**, [S.I.], v. 49, p. 217-223, fev. 2018. Elsevier BV.  
<http://dx.doi.org/10.1016/j.copbio.2017.10.007>.

LIVNEY, Y. D. Milk proteins as vehicles for bioactives. **Current Opinion In Colloid & Interface Science**, [S.I.], v. 15, n. 1-2, p. 73-83, abr. 2010. Elsevier BV.  
<http://dx.doi.org/10.1016/j.cocis.2009.11.002>.

LORTON, C. M.; GRIFFIN, O.; HIGGINS, K.; ROULSTON, F.; STEWART, G.; GOUGH, N.; BARNES, E.; AKTAS, A.; WALSH, T. D. Late referral of cancer patients with malnutrition to dietitians: a prospective study of clinical practice. **Supportive Care In Cancer**, [S.I.], v. 28, n. 5, p. 2351-2360, 4 set. 2019. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1007/s00520-019-05042-2>.

MARINO, M.; INNOCENTE, N.; CALLIGARIS, S.; MAIFRENI, M.; MARANGONE, A.; NICOLI, M. C. Viability of probiotic *Lactobacillus rhamnosus* in structured emulsions containing saturated monoglycerides. **Journal Of Functional Foods**, [S.I.], v. 35, p. 51-59, ago. 2017. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jff.2017.05.012>.

MARSHALL, K. Therapeutic applications of whey protein. **Altern Med Ver**, v. 9, n. 2, p. 136-56, 2004.

MARTINS, E. M. F.; RAMOS, A. M.; VANZELA, E. S. L.; STRINGHETA, P. C.; PINTO, C. L. O.; MARTINS, J. M. Products of vegetable origin: a new alternative for the consumption of probiotic bacteria. **Food Research International**, [S.I.], v. 51, n. 2, p. 764-770, maio 2013. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodres.2013.01.047>.

MATEJČEKOVÁ, Z.; LIPTÁKOVÁ, D.; VALÍK, Ľ. Functional probiotic products based on fermented buckwheat with *Lactobacillus rhamnosus*. **Lwt - Food Science And Technology**, [S.I.], v. 81, p. 35-41, ago. 2017. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.lwt.2017.03.018>.

MATTILA-SANDHOLM, Tiina (ed.). **Functional Dairy Products**. England: Woodhead Publishing, 2003. 392 p. ISBN 9781855735842.

METIN, M. **Süt Teknolojisi (Dairy Technology)**, sixth ed. E.U. Muhendislik Fakultesi Yayınları, İzmir. 2005. ISBN 9789754832792.

METSÄMUURONEN, S.; NYSTRÖM, M. Enrichment of  $\alpha$ -lactalbumin from diluted whey with polymeric ultrafiltration membranes. **Journal Of Membrane Science**, [S.I.], v. 337, n. 1-2, p. 248-256, jul. 2009. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.memsci.2009.03.052>.

MILLER, G. D. JARVIS, J. K. MCBEAN, L. D. **Handbook of Dairy Products and Nutrition**. 2ª Edição. CRC Press LLC, Illinois, 2000.

MINEKUS, M.; MARTEAU, P.; HAVENAAR, R.; VELD, J. H. A Multicompartmental Dynamic Computer-controlled Model Simulating the Stomach and Small Intestine. **Alternatives To Laboratory Animals**, [S.I.], v. 23, n. 2, p. 197-209, mar. 1995. SAGE Publications. <http://dx.doi.org/10.1177/026119299502300205>.

MÖLLER, N. P.; SCHOLZ-AHRENS, K. E.; ROOS, N.; SCHREZENMEIR, J. Bioactive peptides and proteins from foods: indication for health effects. **European Journal Of Nutrition**, [S.I.], v. 47, n. 4, p. 171-182, 27 maio 2008. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1007/s00394-008-0710-2>.

MONTECINO-RODRIGUEZ, E.; BERENT-MAOZ, B.; DORSHKIND, K. Causes, consequences, and reversal of immune system aging. **Journal Of Clinical Investigation**, [S.I.], v. 123, n. 3, p. 958-965, 1 mar. 2013. American Society for Clinical Investigation. <http://dx.doi.org/10.1172/jci64096>.

MORAES, A. C. F.; SILVA, I. T.; ALMEIDA-PITITTO, B.; FERREIRA, S. R. G. Microbiota intestinal e risco cardiometabólico: mecanismos e modulação dietética. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia**, [S.l.], v. 58, n. 4, p. 317-327, jun. 2014. FapUNIFESP (SciELO). <http://dx.doi.org/10.1590/0004-2730000002940>.

NERI-NUMA, I. A.; SANCHO, R. A. S.; PEREIRA, A. P. A.; PASTORE, G. M. Small Brazilian wild fruits: nutrients, bioactive compounds, health-promotion properties and commercial interest. **Food Research International**, [S.l.], v. 103, p. 345-360, jan. 2018. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodres.2017.10.053>.

NEVES, B. S. Aproveitamento de subprodutos da indústria de laticínios. In: **Embrapa Gado de Leite**. Sustentabilidade da Pecuária de leite no Brasil: qualidade e segurança alimentar. 2001.

OLIVEIRA, G. S.; OLIVEIRA, L. S. P.; CAVALLARI, M. E.; GOMES, M. L.; PAIVA, V. B. **MDLGV - Indústria LTDA**: processo produtivo de whey protein. 2018. 204 f. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação) — Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Apucarana, 2018.

OLIVEIRA, G.; GONZÁLEZ-MOLERO, I. Actualización de probióticos, prebióticos y simbióticos en nutrición clínica. **Endocrinología y Nutrición**, [S.l.], v. 63, n. 9, p. 482-494, nov. 2016. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.endonu.2016.07.006>.

ORDÓÑEZ, J. A.; GARCÍA DE FERNANDO, G. D. **Tecnologia de alimentos de origem animal**. vol 2. Porto Alegre. Artmed, 2005.

ORDÓÑEZ, J. A.; **Tecnologia de alimentos: Componentes dos alimentos e processos**. vol 1. Porto Alegre. Artmed, 2005.

OZ, H. Nutrients, Infectious and Inflammatory Diseases. **Nutrients**, [S.l.], v. 9, n. 10, p. 1085, 30 set. 2017. MDPI AG. <http://dx.doi.org/10.3390/nu9101085>.

PARK, J.; FLOCH, M. H. Prebiotics, Probiotics, and Dietary Fiber in Gastrointestinal Disease. **Gastroenterology Clinics Of North America**, [S.l.], v. 36, n. 1, p. 47-63, mar. 2007. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.gtc.2007.03.001>.

PATEL, M. A.; OU, M. S.; HARBRUCKER, R.; ALDRICH, H. C.; BUSZKO, M. L.; INGRAM, L. O.; SHANMUGAM, K. T. Isolation and Characterization of Acid-Tolerant, Thermophilic Bacteria for Effective Fermentation of Biomass-Derived Sugars to Lactic Acid. **Applied And Environmental Microbiology**, [S.l.], v. 72, n. 5, p. 3228-3235, maio 2006. American Society for Microbiology. <http://dx.doi.org/10.1128/aem.72.5.3228-3235.2006>.

PENG, C. T.; WU, K. H.; LAN, S. J.; TSAI, J. J. P.; TSAI, F. J.; TSAI, C. H. Amino acid concentrations in cerebrospinal fluid in children with acute lymphoblastic leukemia undergoing chemotherapy. **European Journal Of Cancer**, [S.l.], v. 41, n. 8, p. 1158-1163, maio 2005. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ejca.2005.02.013>.

PENNINGS, B.; GROEN, B.; LANGE, A.; GIJSEN, A. P.; ZORENC, A. H.; SENDEN, J. M. G.; VAN LOON, L. J. C. Amino acid absorption and subsequent muscle protein accretion following graded intakes of whey protein in elderly men. **American Journal Of Physiology-Endocrinology And Metabolism**, [S.l.], v. 302, n. 8, p. 992-999, 15 abr. 2012. American Physiological Society.

<http://dx.doi.org/10.1152/ajpendo.00517.2011>.

PEREIRA, E. P. R.; FARIA, J. A. F.; CAVALCANTI, R. N.; GARCIA, R. K. A.; SILVA, R.; ESMERINO, E. A.; CAPPATO, L. P.; ARELLANO, D. B.; RAICES, R. S. L.; SILVA, M. C. Oxidative stress in probiotic Petit Suisse: is the jabuticaba skin extract a potential option?. **Food Research International**, [S.l.], v. 81, p. 149-156, mar. 2016. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodres.2015.12.034>.

PEREIRA, M. C.; STEFFENS, R. S.; JABLONSKI, A.; HERTZ, P. F.; RIOS, A. O.; VIZZOTTO, M.; FLÔRES, S. H. Characterization and Antioxidant Potential of Brazilian Fruits from the Myrtaceae Family. **Journal Of Agricultural And Food Chemistry**, [S.l.], v. 60, n. 12, p. 3061-3067, 19 mar. 2012. American Chemical Society (ACS). <http://dx.doi.org/10.1021/jf205263f>.

PIMENTEL, C. V. M. B.; ELIAS, M. F.; PHILIPPI, S. T. **Alimentos Funcionais e Compostos Bioativos**. Editora Manole, [S.l.]. 2019.

PINEDO, M.; LINARES, C.; MENDOZA, H.; ANGUIZ, R. **Plan de mejoramiento genético de camu-camu**. Iquitos: Instituto de Investigación de La Amazonía Peruana, 2004. 52 p. ISBN 9972667073.

POSSEMIERS, S.; MARZORATI, M.; VERSTRAETE, W.; WIELE, T. van de. Bacteria and chocolate: a successful combination for probiotic delivery. **International Journal Of Food Microbiology**, [S.L.], v. 141, n. 1-2, p. 97-103, 30 jun. 2010. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2010.03.008>.

RAIZEL, R.; SANTINI, E.; KOPPER, A. M.; REIS FILHO, A. D. Efeitos do consumo de probióticos, prebióticos e simbióticos para o organismo humano. **Revista Ciência & Saúde**, Porto Alegre, v. 4, n. 2, p. 66-74, 2011.

RAVASCO, P. Nutrition in Cancer Patients. **Journal Of Clinical Medicine**, [S.l.], v. 8, n. 8, p. 1211, 14 ago. 2019. MDPI AG. <http://dx.doi.org/10.3390/jcm8081211>.

RENNER, E. Nutritional Aspects. **Whey And Lactose Processing**, [S.l.], p. 449-471, 1992. Springer Netherlands. [http://dx.doi.org/10.1007/978-94-011-2894-0\\_12](http://dx.doi.org/10.1007/978-94-011-2894-0_12).

RIBEIRO, P. F. A.; STRINGHETA, P. C.; OLIVEIRA, E. B.; MENDONÇA, A. C.; SANT'ANA, H. M. P. Teor de vitamina C,  $\beta$ -caroteno e minerais em camu-camu cultivado em diferentes ambientes. **Ciência Rural**, [S.l.], v. 46, n. 3, p. 567-572, 30 nov. 2015. FapUNIFESP (SciELO). <http://dx.doi.org/10.1590/0103-8478cr20150024>.

RIPPLE, M. O.; WILDING, G.; HENRY, W. F.; RAGO, R. P. Prooxidant-Antioxidant Shift Induced by Androgen Treatment of Human Prostate Carcinoma Cells. **Jnci Journal Of The National Cancer Institute**, [S.l.], v. 89, n. 1, p. 40-48, 1 jan. 1997. Oxford University Press (OUP). <http://dx.doi.org/10.1093/jnci/89.1.40>.

RODRIGUES, R. B.; MENEZES, H. C.; CABRAL, L. M. C.; DORNIER, M.; REYNES, M. An Amazonian fruit with a high potential as a natural source of vitamin C: the camu-camu (*myrciaria dubia*). **Fruits**, [S.I.], v. 56, n. 5, p. 345-354, set. 2001. EDP Sciences. <http://dx.doi.org/10.1051/fruits:2001135>.

ROSA, R. **Foto da frutífera Camu camu**. In: EMBRAPA. 2013. Disponível em: <https://www.embrapa.br/busca-de-imagens/-/midia/987001/camu-camu>. Acesso em: 29 nov. 2021.

RUFINO, M. S. M.; ALVES, R. E.; FERNANDES, F. A. N.; BRITO, E. S. Free radical scavenging behavior of ten exotic tropical fruits extracts. **Food Research International**, [S.I.], v. 44, n. 7, p. 2072-2075, ago. 2011. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodres.2010.07.002>.

SANDERS, M. E.; GIBSON, G. R.; GILL, H. S.; GUARNER, F. Probiotics: their potential to impact human health. **Council for Agricultural Science and Technology (CAST)**, 36. CAST, Ames, Iowa. 2007. ISSN 1070-0021.

SAYARLIOGLU, H.; ERKOC, R.; DEMIR, C.; DOGAN, E.; SAYARLIOGLU, M.; ONER, A. F.; DILEK, I. Nutritional Status and Immune Functions in Maintenance Hemodialysis Patients. **Mediators Of Inflammation**, [S.I.], v. 2006, p. 1-4, 2006. Hindawi Limited. <http://dx.doi.org/10.1155/mi/2006/20264>.

SCALBERT, A.; MANACH, C.; MORAND, C.; RÉMÉSY, C.; JIMÉNEZ, L. Dietary Polyphenols and the Prevention of Diseases. **Critical Reviews In Food Science And Nutrition**, [S.I.], v. 45, n. 4, p. 287-306, jun. 2005. Informa UK Limited. <http://dx.doi.org/10.1080/1040869059096>.

SEKIROV, I.; RUSSELL, S. L.; ANTUNES, L. C. M.; FINLAY, B. B. Gut Microbiota in Health and Disease. **Physiological Reviews**, [S.I.], v. 90, n. 3, p. 859-904, jul. 2010. American Physiological Society. <http://dx.doi.org/10.1152/physrev.00045.2009>.

SETLOW, P. Germination of Spores of Bacillus Species: what we know and do not know. **Journal Of Bacteriology**, [S.I.], v. 196, n. 7, p. 1297-1305, abr. 2014. American Society for Microbiology. <http://dx.doi.org/10.1128/jb.01455-13>.

SINGH, A. K.; CABRAL, C.; KUMAR, R.; GANGULY, R.; RANA, H. K.; GUPTA, A.; LAURO, M. R.; CARBONE, C.; REIS, F.; PANDEY, A. K. Beneficial Effects of Dietary Polyphenols on Gut Microbiota and Strategies to Improve Delivery Efficiency. **Nutrients**, [S.I.], v. 11, n. 9, p. 2216, 13 set. 2019. MDPI AG. <http://dx.doi.org/10.3390/nu11092216>.

SMITHERS, G. W.; BALLARD, F. J.; COPELAND, A. D.; SILVA, K. J.; DIONYSIUS, D. A.; FRANCIS, G. L.; GODDARD, C.; GRIEVE, P. A.; MCINTOSH, G. H.; MITCHELL, I. R. New Opportunities from the Isolation and Utilization of Whey Proteins. **Journal Of Dairy Science**, [S.I.], v. 79, n. 8, p. 1454-1459, ago. 1996. American Dairy Science Association. [http://dx.doi.org/10.3168/jds.s0022-0302\(96\)76504-9](http://dx.doi.org/10.3168/jds.s0022-0302(96)76504-9).

SMITHERS, G. W. Whey and whey proteins—From ‘gutter-to-gold’. **International Dairy Journal**, [S.I.], v. 18, n. 7, p. 695-704, jul. 2008. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.idairyj.2008.03.008>.

SOONG, Y.; BARLOW, P. J. Antioxidant activity and phenolic content of selected fruit seeds. **Food Chemistry**, [S.I.], v. 88, n. 3, p. 411-417, dez. 2004. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2004.02.003>.

SPINOSA, M. R.; BRACCINI, T.; RICCA, E.; FELICE, M.; MORELLI, L.; POZZI, G.; OGGIONI, M. R. On the fate of ingested Bacillus spores. **Research In Microbiology**, [S.I.], v. 151, n. 5, p. 361-368, jun. 2000. Elsevier BV. [http://dx.doi.org/10.1016/s0923-2508\(00\)00159-5](http://dx.doi.org/10.1016/s0923-2508(00)00159-5).

SRINIVASAN, S. P. B.; RAIPURIA, M.; BAHARI, H.; KAAKOUSH, N. O.; MORRIS, M. J. Impacts of Diet and Exercise on Maternal Gut Microbiota Are Transferred to Offspring. **Frontiers In Endocrinology**, [S.I.], v. 9, p. 1-12, 29 nov. 2018. Frontiers Media SA. <http://dx.doi.org/10.3389/fendo.2018.00716>.

TAM, N. K. M.; UYEN, N. Q.; HONG, H. A.; DUC, L. H.; HOA, T. T.; SERRA, C. R.; HENRIQUES, A. O.; CUTTING, S. M. The Intestinal Life Cycle of Bacillus subtilis and Close Relatives. **Journal Of Bacteriology**, [S.I.], v. 188, n. 7, p. 2692-2700, abr. 2006. American Society for Microbiology. <http://dx.doi.org/10.1128/jb.188.7.2692-2700.2006>.

TRIPATHI, M. K.; GIRI, S. K. Probiotic functional foods: survival of probiotics during processing and storage. **Journal Of Functional Foods**, [S.I.], v. 9, p. 225-241, jul. 2014. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jff.2014.04.030>.

USDEC. 2008. **Produtos de soro de leite**. Conselho de Exportação de Laticínios dos Estados Unidos. Disponível em: <https://www.thinkusadairy.org/pt-br/home/about-usdec>. Acesso em: 21 jan. 2021.

VANDENPLAS, Y. Letter: identification of probiotics by specific strain name - author's reply. **Alimentary Pharmacology & Therapeutics**, [S.I.], v. 35, n. 7, p. 860-860, 8 mar. 2012. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-2036.2012.05026.x>.

VANDENPLAS, Y.; HUYS, G.; DAUBE, G. Probiotics: an update. **Jornal de Pediatria (Versão em Português)**, [S.I.], v. 91, n. 1, p. 6-21, jan. 2015. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jpedp.2014.08.006>.

VENTURA, R. **Guia reúne 196 ingredientes brasileiros e receitas de pratos típicos**. 2015. Disponível em: <https://www1.folha.uol.com.br/comida/2015/04/1616663-guia-reune-196-ingredientes-brasileiros-e-receitas-de-pratos-tipicos.shtml>. Acesso em: 29 nov. 2021.

VIDAL, A. M. C. **Obtenção e processamento do leite e derivados**. Pirassununga: Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos da Universidade de São Paulo, 2018. 220 p. ISBN 978-85-66404-17-3. DOI 10.11606/9788566404173.

VILLACHICA, H. L. **El cultivo del camu-camu (*Myrciaria dubia* (H.B.K.) McVaugh) en la Amazonia peruana.** 1 ed. Lima: Mirigraf, 1996.

VOLPI, E.; KOBAYASHI, H.; SHEFFIELD-MOORE, M; MITTENDORFER, B.; WOLFE, R. R. Essential amino acids are primarily responsible for the amino acid stimulation of muscle protein anabolism in healthy elderly adults. **The American Journal Of Clinical Nutrition**, [S.I.], v. 78, n. 2, p. 250-258, 1 ago. 2003. Oxford University Press (OUP). <http://dx.doi.org/10.1093/ajcn/78.2.250>.

WALZEM, R. L.; DILLARD, C. J.; GERMAN, J. B. Whey components: millennia of evolution create functionalities for mammalian nutrition. **Critical Reviews In Food Science And Nutrition**, [S.I.], v. 42, n. 4, p. 353-375, jul. 2002. Informa UK limited. <http://dx.doi.org/10.1080/10408690290825574>.

WODA, A.; MISHPELLANY-DUTOUR, A.; BATIER, L.; FRANÇOIS, O.; MEUNIER, J-P.; REYNAUD, B.; ALRIC, M.; PEYRON, M-A. Development and validation of a mastication simulator. **Journal Of Biomechanics**, [S.I.], v. 43, n. 9, p. 1667-1673, jun. 2010. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jbiomech.2010.03.002>.

WRIGHT, B. J.; ZEVCHAK, S.; WRIGHT, J. M.; DRAKE, M. A. The Impact of Agglomeration and Storage on Flavor and Flavor Stability of Whey Protein Concentrate 80% and Whey Protein Isolate. **Journal Of Food Science**, [S.I.], v. 74, n. 1, p. 17-29, jan. 2009. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1750-3841.2008.00975.x>.

YADAV, J. S. S.; YAN, S.; PILLI, S.; KUMAR, L.; TYAGI, R. D.; SURAMPALLI, R.Y. Cheese whey: a potential resource to transform into bioprotein, functional/nutritional proteins and bioactive peptides. **Biotechnology Advances**, [S.I.], v. 33, n. 6, p. 756-774, nov. 2015. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.biotechadv.2015.07.002>.

YAHIA, E. M.; CELIS, M. E. M.; SVENDSEN, M. The Contribution of Fruit and Vegetable Consumption to Human Health. **Fruit And Vegetable Phytochemicals**, [S.I.], p. 1-52, 16 out. 2017. John Wiley & Sons, Ltd. <http://dx.doi.org/10.1002/9781119158042.ch1>.

YERLIKAYA, O., KINIK, Ö., AKBULUT, N., 2010. **Peyniralt Suyunun Fonksiyonel Özellikleri ve Peyniraltı suyu Kullanılarak üretilen yeni nesil süt ürünleri (functional properties of whey and new Generation dairy products manufactured with whey).** Gıda v. 35, n. 4, p. 289-296. 2010.

YUYAMA, K.; MENDES, N. B.; VALENTE, J. P. Longevidade de sementes de camu-camu submetidas a diferentes ambientes e formas de conservação. **Revista Brasileira de Fruticultura**, [S.I.], v. 33, n. 2, p. 601-607, 17 jun. 2011. FapUNIFESP (SciELO). <http://dx.doi.org/10.1590/s0100-29452011005000067>.

ZANATTA, C; MERCADANTE, A. Carotenoid composition from the Brazilian tropical fruit camu-camu (*Myrciaria dubia*). **Food Chemistry**, [S.I.], v. 101, n. 4, p. 1526-1532, 2007. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2006.04.004>.

**SEÇÃO 1**

Development of a whey protein-based probiotic dietary supplement (whey protein – WPCI 80%) enriched with camu-camu

MIOLA, Graziella Melissa de Vignalli Florence <sup>1</sup>; HAHN, Cárin Fabíola Pensin <sup>2</sup>;  
SAIBERT, Claudinei Luiz <sup>3</sup>; DA SILVA, Claudia Marques<sup>4</sup>; RICARDO, Letycia  
Lopes<sup>5</sup>; SCHUTZ, Ana Carla Zarpelon <sup>6</sup>

<sup>1</sup>Federal University of Paraná, Palotina campus. Rua Pioneiro, N° 2153, Jardim Dallas, Palotina - PR, CEP: 85950-000. Brazil. graziella.florence77@gmail.com

<sup>2</sup>Science and Technology Park of Biosciences, BIOPARK. PR-182 Highway KM 320/321, Toledo – PR, CEP: 85919-899. Brazil. carin.hahn@biopark.com.br

<sup>3</sup>Science and Technology Park of Biosciences, BIOPARK. PR-182 Highway KM 320/321, Toledo – PR, CEP: 85919-899. Brazil. claudinei.saibert@biopark.com.br

<sup>4</sup>Science and Technology Park of Biosciences, BIOPARK. PR-182 Highway KM 320/321, Toledo – PR, CEP: 85919-899. Brazil. claudia.marques@biopark.com.br

<sup>5</sup>Science and Technology Park of Biosciences, BIOPARK. PR-182 Highway KM 320/321, Toledo – PR, CEP: 85919-899. Brazil. letycialopesr88@gmail.com

<sup>6</sup>Federal University of Paraná, Toledo campus. PR-182 Highway, KM 320/321, Toledo – PR, CEP: 85919-899. ana.zarpelon@ufpr.br

## ABSTRACT

Dietary supplements are preparations designed to provide bioactive nutrients in order to meet the demands of the human body. Thus, this paper aimed to elaborate a probiotic dietary supplement based on Whey Protein WPCI 80% enriched with camu-camu extract, which is intended for sports practitioners. The probiotic microorganism used was *Bacillus coagulans*, whey was used as a protein source and camu-camu extract was used due to the high concentration of vitamin C. For the elaborated formulation, the proposed excipients have been used in order to guarantee stability, in addition to improving the organoleptic characteristics of the final product. The vitamin C content of camu-camu extract was determined by the iodometric method, with a value of 15.84 g/100 grams of extract. The crude protein of the Whey protein input and of the final product was determined through the Kjeldahl method, presenting 77.46 and 48.24 g/100 grams of the product, respectively. The developed supplement showed high biological value in protein and probiotics, in addition to the presence of vitamin C with great antioxidant potential, inhibiting damage caused by free radicals arising from oxidative stress.

**KEYWORDS:** probiotics, vitamin C, camu-camu, whey protein, supplement

## INTRODUCTION

Milk is recognized as the most complete food in nature, presenting important nutritional components, such as proteins, being grouped into two large classes: caseins (80%) and whey proteins (20%) others (AGUIAR et al., 2005). , in addition to water-soluble vitamins such as vitamins B12, vitamin B6, pantothenic acid, riboflavin, thiamine, vitamin C, retinol (vitamin A) and mineral salts (METSÄMUURONEN; NYSTYÖM, 2009).

The whey, known as Whey, English term for whey, has been receiving attention as a component to be used in human nutrition, whether incorporated into different food products, or as a protein source in supplements intended for the diet for athletes, healthy people or with nutritional deficiencies due to some pathology (HARAGUCHI et al., 2006; SMITHERS, 2008).

Whey Protein (WP) is an alternative oral nutritional supplement (ONS) suitable for healthy people, athletes or patients with nutritional deficiencies, due to its lactose and fat free composition, high quality protein with excellent amino acid profiles and high digestibility. (HA; ZEMEL, 2003).

In this context, food supplements arise, which are preparations designed to provide bioactive nutrients such as proteins, amino acids, fibers, vitamins, minerals and fatty acids, aiming to meet the demand of these in the body (RAIZEL et al., 2011).

The concept of functional foods includes foods or food ingredients that contain: prebiotics, probiotics and symbiotics, or bioactive compounds such as antioxidants, minerals, vitamins and active peptides (MATEJČEKOVÁ et al., 2017).

The science related to probiotics is recent and therefore constantly evolving. Probiotic bacteria have many beneficial properties to control the ability of pathogenic bacteria, probiotic microorganisms are generally considered to be beneficial to the health of the host when used in adequate amounts (ÇOMAK GÖÇER et al., 2016; LEBEER et al., 2017).

In addition to incorporating probiotics into food products, probiotic strains are also supplied as dietary supplements, often aimed at treating specific health problems (POSSEMIERS et al., 2010).

*Bacillus coagulans* is a Gram-positive, facultative anaerobic, non-pathogenic, spore-forming, lactic acid-producing bacterium. Some strains of *B. coagulans* are able to survive extremes of heat, where the optimal growth temperature for *B. coagulans* is 35 to 50 °C, to survive stomach acidity and bile acids. The strains of this species are quite heterogeneous and the optimum pH for growth is 5.5 to 6 (AŞAN, 2010; DRAGO; VECCHI, 2009; KARRI et al., 2016).

Camu-camu (*Myrciaria dubia*), a fruit native to the Amazon region, from camucamuzeiro, is of important economic interest, related to the high content of vitamin C, phenolic compounds, in addition to  $\beta$ -carotene and the presence of essential minerals, such as calcium. and potassium, which is responsible for accelerating the intestinal absorption of vitamin C (AKTER et al., 2011; CASTRO, 2018; FUJITA, 2015; RIBEIRO et al., 2016; RUFINO et al., 2011; ZANATTA; MERCADANTE, 2007) .

Studies on the bioavailability of these compounds conclude that their absorption and metabolism is dependent on the non-pathogenic intestinal microbiota, which has a triple function: protective, trophic and metabolic that promotes the fermentation of indigestible dietary residues and endogenous mucus (FLINT et al., 2012).

The human gut contains an intricate ecological community of resident bacteria, known as the gut microbiota, which plays a key role in host homeostasis. Early nutritional intervention with a high intake of proteins, essential nutrients and the use of probiotics with health-promoting properties and in the intestinal microbiome, can result in better nutritional status and quality of life, as well as better tolerance to treatment,

therefore, considering the potentialities of camu-camu and the probiotic *Bacillus coagulans* in the elaboration of foods with health benefits.

Given the above, this research aims to present a proposal for a formulation of a food supplement based on Whey Protein, enriched with camu-camu and *Bacillus coagulans* probiotic microorganism strain.

## MATERIALS AND METHODS

### Obtaining dry extract of camu-camu in natura

The fruits were purchased commercially in the city of Vitória do Xingu, in the state of Pará, in March 2020. The peels, pulp and seeds were frozen and ground in a ninja BL480D model crusher at 20000 rpm for 40 seconds, then frozen again and then freeze-dried at  $-50^{\circ}\text{C}$  for 72 hours, protected from light (Figure 1).

This technique is also called cryodehydration or cryo-drying, it is a cold drying process, a controllable method of dehydration of labile products by vacuum desiccation, which occurs when the temperature and partial pressure of the water vapor are lower than the triple point of the water (GARCIA, 2009; Semyonov et al., 2010; FOOD INGREDIENTS BRASIL, 2013).

According to Koroishi (2005), the advantages of the lyophilization process are the obtaining of a product with high quality, in which it presents low thermal degradation, concomitantly with retention of volatile materials that provide aroma and flavor to the product, and with a rigid structure after drying.

Figure 1 - *In-natura* camu-camu extracts after lyophilization



Source: Elaborated by the authors (2021).

Obtaining commercial camu-camu dry extract

Commercial camu-camu extract by Florien Fitoativos (Figure 2).

Figure 2 - Commercial camu-camu powder extracts



Source: Elaborated by the authors (2021).

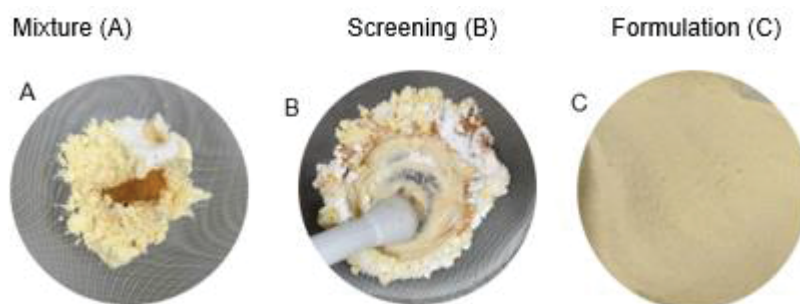
Obtaining the *Bacillus coagulans* strain

*Bacillus coagulans* - CGMCC 1.6565 ( $1 \times 10^9$  CFU/g) was purchased by Laboratorio Biosamer in Chile.

Product formulation

The food supplement was designed by mixing inputs previously weighed and screened in an 8 mesh (2.36 mm) sieve. Among the inputs, 80% Whey Protein concentrate, camu-camu extract, *Bacillus coagulans*, cinnamon, condensed milk flavoring, xanthan gum, xylitol, apple sugar and colloidal silicon dioxide were used (Figure 3).

Figure 3 - Formulation Process



Source: Elaborated by the authors (2021).

#### Determination of the pH of camu-camu extracts

The pH of the extracts was evaluated using a pHmeter MPA-210 (GEHAKA PG1800) previously calibrated in standard buffer solutions with pH 7.0 and pH 4.0. After calibrating the device, 10g of each extract in 0.1 L of water were transferred to a 0.25 L beaker, and the electrode was immersed, followed by reading (IAL, 2004). The analysis was carried out in triplicate.

#### Determination of vitamin C from camu-camu extracts.

Vitamin C is quantified by means of ascorbic acid, which undergoes oxidation and acts as a reducing agent in the iodine solution, which when reduced forms hydroiodic acid (Reaction 1). The amount of ascorbic acid contained in camu-camu extracts was determined by direct titration with potassium iodate (KIO<sub>3</sub>) and iodine (I<sub>2</sub>) (IAL, 2004). The starch suspension added to the mixture forms a complex with the iodine molecules that presents a blue/purple color, used as a visual indicator of the process. The ascorbic acid content was calculated using Equation 1. The result was expressed in grams of ascorbic acid/100 g of extract.

$$AA = \frac{V_a \times F_c \times 8,806}{m_a} \times 100 \quad (1)$$

Where: AA is the total ascorbic acid content of the sample,  $V_a$  is the volume of iodine spent in the titration (mL), FC is the correction factor of the 0.1 mol L<sup>-1</sup> iodine solution, 8.806 is the equivalent amount of ascorbic acid per mL of iodine 0.1 mol L<sup>-1</sup> and  $m_a$  is the sample mass (mg) used in the titration.



Determination of crude protein in whey protein and in the formulation obtained.

Whey Protein Concentrate (WPCI 80) was commercially obtained by Sooro. The crude protein of the Whey Protein input and the final product was determined through the Kjeldahl process, which follows the steps of digestion, distillation and sample titration (AOAC, 1998). Approximately 0.2 g of sample was placed in a digestion tube and 0.01 L of H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> and 2.5 g of catalytic mixture (Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>:CuSO<sub>4</sub> 1:100 m/m) were added. Then, the tubes were coupled to a digester block (model 040125, Tecnal), and the temperature was gradually increased until reaching 350 °C and maintained for 5 h. In this step, nitrogen was converted into ammonia and the organic compounds into carbon dioxide and water. After that, 0.04 L of 50% sodium hydroxide was added to the tubes, and ammonia distillation began in a semi-automatic nitrogen still (model TE0364, Tecnal), and the ammonia was collected in an erlenmeyer flask containing 0.03 L of 4% boric acid and 5 drops of mixed indicator (methyl red and bromocresol green). Subsequently, titration was performed with 0.10 mol L<sup>-1</sup> hydrochloric acid, with a known correction factor. The nitrogen content was calculated using Equation 2.

$$N (\%) = \frac{V * C * f * 14 * 100}{m} \text{ (2)}$$

Where: N is the percentage of total nitrogen in the sample, V is the volume of hydrochloric acid spent in the titration (mL), C is the concentration of hydrochloric acid (mol L<sup>-1</sup>), f is the correction factor for hydrochloric acid and m is the sample mass (mg).

Then, the total nitrogen of the sample was converted into crude protein using the specific factor of 6.38 (IAL, 2004), and calculated through Equation 3.

$$PB (\%) = N (\%) * FE \text{ (3)}$$

Where: PB is the percentage of crude protein contained in the sample, N is the percentage of total nitrogen in the sample, and FE is the specific factor.

The result was expressed in grams of crude protein/100 g of product.

## RESULTS AND DISCUSSION

### Product formulation

The proportions indicated in Table 1, after homogenizing the inputs for one minute, the 30 g of the product were packed in amber packaging (Figure 2).

Table 1 – Formulation composition

	Item	Ingredient	Quantity (g)
Active Input	1	Whey Protein Isolate (WPI 80)	20
	2	Camu-camu extract	0.3
	3	<i>Bacillus coagulans</i>	1
Excipients	4	Cinnamon	0.5
	5	Condensed Milk	5
	6	Xanthan Gum	0.1
	7	Xylitol	1.5
	8	Apple sugar	1.5
	9	Colloidal Silicon Dioxide	0.1
<b>TOTAL</b>			<b>30</b>

Source: Elaborated by the authors (2021).

For the elaborate formulation, the proposed excipients were used in order to guarantee stability, in addition to improving the organoleptic characteristics of the final product, and thus, promoting a better acceptance by the consumer. The concentrations used for the development of the food supplement are in agreement with Rowe et al. (2009) in their book titled Handbook of Pharmaceutical Excipients.

Cinnamon and the aroma identical to natural condensed milk were used as flavoring agents, responsible for imparting the flavor and aroma to the final product. Xanthan gum is an agent used to increase the viscosity of the external phase of a

suspension, reducing the sedimentation rate of the particles, being considered a viscosity donor agent to the medium (FERREIRA; VILLANOVA, 2006).

Xylitol and apple sugar are sweeteners used to sweeten the preparation (FERREIRA; VILLANOVA, 2006). Colloidal silicon dioxide is an adsorbent, acting as a viscosity donor to the medium (ROWE et al., 2009)

#### Determination of pH and ascorbic acid in camu-camu extracts.

The pH values obtained were very close, and indicated that the pH of the extracts is acidic (pH<7), being 2.45 and 2.33 for the in natura and commercial extracts, respectively. The concentration of ascorbic acid in the commercial sample was five times higher than in the in-natura sample. This difference may be related to the maturation stage of the fruit, since the samples presented different colors, and the concentration of ascorbic acid increases with maturation (Table 2) (YUYAMA et al., 2002).

<b>Extracts</b>	<b>pH determinations</b>	<b>Ascorbic acid content (g/ 100g of extract)</b>
<i>In-natura</i> Camu-camu	2,45	2.94
Commercial Camu-camu	2,33	15.84

Source: Elaborated by the authors (2021).

The human organism does not synthesize vitamin C, so the choice of camu-camu was due to the high content of ascorbic acid, and the presence of phenolic compounds in its bark, pulp and seeds (CHIRINOS et al., 2010). As the product was formulated for sports practitioners, vitamin C provides antioxidant activity by inhibiting injuries caused by free radicals from oxidative stress, preventing the formation of lesions and loss of cell integrity. In addition, vitamin C participates in the synthesis collagen that increases the level of healing (MAY; QU, 2005).

Studies also highlight other important compounds of camu-camu for human health, such as  $\beta$ -carotene and the presence of essential minerals such as calcium and potassium, which are responsible for accelerating the intestinal absorption of

vitamin C (RIBEIRO et al., 2016; YUYAMA et al., 2002; ZANATTA; MERCADANTE, 2007).

According to Anvisa (RDC No. 269, of September 22, 2005), the recommended daily intake of vitamin C is 45mg for adults. For this reason, 0.3g of the commercial camu-camu extract was used in the formulation. The *in natura* extract showed low solubility in the finished product (30g) after being diluted in water (0.18 L). Moreover, due to the lower amount of vitamin C, it would need a much larger amount of dry extract than the commercial extract. Thus, we have opted for using the commercial extract in the preparation of the formulation (ANVISA, 2005).

Determination of the crude protein content in Whey protein and in the food supplement.

The crude protein content was determined in the Whey Protein WPCI 80% commercial product and in the prepared dietary supplement (Table 3). The results showed that Whey Protein WPCI 80% has 77.46% crude protein in its composition. Thus, the amount of 20g of Whey Protein WPCI 80% used in the formulation (Table 1) provided 14.77g of crude protein, which corresponds to 49.24% per 30g serving. This proposed amount of crude protein for the developed supplement is in accordance with RDC n° 269/2005 and with other commercial supplements ranging from 15g to 22g.

Table 3 - Determination of crude protein in Whey Protein WPCI 80% and in dietary supplement

<b>Products</b>	<b>Crude Protein (g/ 100g of the product)</b>
Whey Protein WPCI 80%	77.46
Dietary Supplement	49.24

Source: Elaborated by the authors (2021).

### Bacillus Results

Some species of probiotics, for instance the lactobacilli, are very sensitive to normal physiological conditions, such as low stomach pH and bile salts, and the viability of bacteria is affected by manufacturing, storage and transport methods. In this sense, according to Bressuire-Isoard et al. (2018), *B. coagulans* survive in the stomach in the form of spores and germinates in the small intestine, thus exerting their probiotic

effect. Consequently, they present themselves as a great option due to their high ability to resist extremes, such as heat, stomach acidity and bile salts, and because of these characteristics, they survive passage through the gastrointestinal tract (BRESSUIRE-ISOARD et al., 2018; KELLER et al., 2019). In addition, they are resistant to antibiotics, being non-transferable to pathogenic bacteria, they do not show signs of toxicity or mutagenic effects, showing negative results for chromosomal aberrations (BRESSUIRE-ISOARD et al., 2018; MONGKOLTHANARUK et al., 2011).

For the elaborated formulation, the proposed excipients were used in order to guarantee stability and improve the organoleptic characteristics of the final product. Thus, promoting a better acceptance by the consumer. The concentrations used for the development of the dietary supplement are in agreement with Rowe et al. (2009) on their book entitled Handbook of Pharmaceutical Excipients.

Cinnamon and flavor identical to natural condensed milk were used as flavoring agents, responsible for giving the final product the flavor and aroma. Xanthan gum is an agent used to increase the viscosity of the external phase of a suspension, reducing the sedimentation speed of particles, being considered a donor agent of viscosity to the medium (FERREIRA; VILLANOVA, 2006).

Xylitol and apple sugar are sweeteners used to sweeten the preparation (FERREIRA; VILLANOVA, 2006). Colloidal silicon dioxide is an adsorbent, which acts as a viscosity donor to the medium (ROWE et al., 2009).

## **CONCLUSION**

The WPCI 80% probiotic food supplement, enriched with camu-camu extract was designed to meet the demands of the organization of sports practitioners, being also suitable for healthy people or for patients with nutritional deficiencies. Due to the high resistance of *Bacillus coagulans* to temperature and acidity, added to the Vitamin C content of camu-camu, it was decided to use it in the formulation, as it is a bacterial species that produces lactic acid, which has an essential attribute to be used as a probiotic. Probiotic microorganisms belonging to the genus *Bacillus* spp. are nutritionally attractive because of their inherent stability as a spore-forming bacteria. Spores allow a prolonged shelf life and increase the ability of the microorganism to survive gastric barriers, which proves to be an advantage over lactobacilli.

The excipients used for the formulation were proposed in order to guarantee the stability and improve the organoleptic characteristics of the final product. The results show that a food supplement was obtained based on Whey Protein, enriched with camu-camu and *Bacillus coagulans* qu'un probiotic microorganism strain, which showed satisfactory results in terms of protein content and resistance to acidity.

#### ACKNOWLEDGEMENT

We would like to acknowledge the Master's Program in Biotechnology, UFPR-Palotina, the Scientific and Technological Park of Biosciences - Biopark, Prati-Donaduzzi Pharmaceutical Industry and Biosamer - Chile.

## REFERENCES

- AGUIAR, C. L.; CORÓ, F.A.G.; PEDRÃO, M.R. Componentes ativos de origem animal. **Boletim do Centro de Pesquisa de Processamento de Alimentos**. [S.l.], 2005. Disponível em: <https://revistas.ufpr.br/alimentos/article/view/4476/3499>. Acesso em: 27 nov. 2021.
- AKTER, M. S.; OH, S.; EUN, J.; AHMED, M. (2011). Nutritional compositions and health promoting phytochemicals of camu-camu (*myrciaria dubia*) fruit: a review. **Food Research International**, [S.l.], v. 44, n. 7, p. 1728-1732, ago. 2011. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodres.2011.03.045>.
- ANVISA. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. (2005). Resolução da Diretoria Colegiada – RDC nº 269, de 22 de setembro de 2005. **Dispõe sobre o regulamento técnico sobre a ingestão diária recomendada (IDR) de proteína, vitaminas e minerais**. 2005.
- AOAC. **Official Method of Analysis**. (1998). 15° Ed. Association of Official Analytical Chemists, Washington DC, 1998.
- AŞAN ÖZÜSAĞLAM, M. (2010). Importance of *Bacillus coagulans* Bacterium as Probiotic in Animal Nutrition. **Süleyman Demirel Üniv. Ziraat Fak. Derg.** 2010.
- BERNARDEAU, M.; LEHTINEN, M. J.; FORSSTEN, S. D.; NURMINEN, P. (2017). Importance of the gastrointestinal life cycle of *Bacillus* for probiotic functionality. **Journal Of Food Science And Technology**, [S.l.], v. 54, n. 8, p. 2570-2584, 23 maio 2017. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1007/s13197-017-2688-3>.
- BRESSUIRE-ISOARD, C.; BROUSSOLLE, V.; CARLIN, F. (2018). Sporulation environment influences spore properties in *Bacillus*: evidence and insights on underlying molecular and physiological mechanisms. **Fems Microbiology Reviews**, [S.l.], v. 42, n. 5, p. 614-626, 17 maio 2018. Oxford University Press (OUP). <http://dx.doi.org/10.1093/femsre/fuy021>.
- CASTRO, J. C.; MADDOX, J. D.; IMÁN, S. A. (2018). Camu-camu— *Myrciaria dubia* (Kunth) McVaugh. **Exotic Fruits**. Elsevier. 2018. ISBN 9780128031384.
- CHIRINOS, R.; GALARZA, J.; BETALLELUZ-PALLARDEL, I.; PEDRESCHI, R.; CAMPOS, D. (2010). Antioxidant Compounds and Antioxidant Capacity of Peruvian Camu- camu (*Myrciaria dubia* (H.B.K.) (McVaugh) Fruit at Different Maturity Stages. **Food Chemistry**, v. 120, n. 4, jun. 2010.
- ÇOMAK GÖÇER, E. M.; ERGIN, F.; AŞCI ARSLAN, A.; KÜÇÜKÇETİN, A. (2016). **Farklı İnkübasyon Sıcaklığı ile İnkübasyon Sonlandırma pH'sının Probiyotik Yoğurdun Fizikokimyasal ve Mikrobiyolojik Özellikleri Üzerine Etkisi**. *Akademik Gıda*, c. 14, sayı. 4, ss. 341-350, Ara. 2016.

DRAGO, L.; VECCHI, E. (2009). Should Lactobacillus sporogenes and Bacillus coagulans Have a future? **Journal Of Chemotherapy**, [S.l.], v. 21, n. 4, p. 371-377, ago. 2009. Informa UK Limited. <http://dx.doi.org/10.1179/joc.2009.21.4.371>.

FERREIRA, A. O.; VILLANOVA, J. (2006). **Excipientes e adjuvantes farmacotécnicos**. São Paulo: [s.n.], 2006. p. 135.

FLINT, H. J.; SCOTT, K. P.; LOUIS, P.; DUNCAN, S. H. (2012). The role of the gut microbiota in nutrition and health. *Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology*, [S.l.], v. 9, n. 10, p. 577-589, 4 set. 2012. **Springer Science and Business Media LLC**. <http://dx.doi.org/10.1038/nrgastro.2012.156>.

FUJITA, A. (2015). **Produtos derivados do camu-camu: efeito da secagem sobre elagitaninos e flavonoides, atividade antioxidante e antimicrobiana**. 149 f. Tese (Doutorado em Bromatologia) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2015. Doi: 10.11606/T.9.2015.tde-24092015-083939.

HA, E.; ZEMEL, M. B. (2003). Functional properties of whey, whey components, and essential amino acids: mechanisms underlying health benefits for active people (review). **The Journal Of Nutritional Biochemistry**, [S.l.], v. 14, n. 5, p. 251-258, maio 2003. Elsevier BV. [http://dx.doi.org/10.1016/s0955-2863\(03\)00030-5](http://dx.doi.org/10.1016/s0955-2863(03)00030-5).

HARAGUCHI, F. K.; ABREU, W. C.; PAULA, H. (2006). Proteínas do soro do leite: composição, propriedades nutricionais, aplicações no esporte e benefícios para a saúde humana. **Revista de Nutrição**, [S.l.], v. 19, n. 4, p. 479-488, ago. 2006. FapUNIFESP (SciELO). <http://dx.doi.org/10.1590/s1415-52732006000400007>.

INSTITUTO ADOLFO LUTZ. (2004). **Métodos Físico-Químicos para Análise de Alimentos**. 4a. Edição. São Paulo: Instituto Adolfo Lutz, 2004. 1032p.

KARRI S. K., MAJEED M., NATARAJAN S., SIVAKUMAR A., ALI F., PANDE A., MAJEED S. (2016). Evaluation of anti-diarrhoeal activity of Bacillus coagulans MTCC 5856 and its effect on gastrointestinal motility in wistar rats. **Int. J. Pharm. Biol. Sci.** v. 7, n. 1, p. 311-316. 2016.

LEBEER, S.; A BRON, P.; MARCO, M. L.; VAN PIJKEREN, J.; MOTHERWAY, M. O.; HILL, C.; POT, B.; ROOS, S.; KLAENHAMMER, T. (2018). Identification of probiotic effector molecules: present state and future perspectives. **Current Opinion In Biotechnology**, [S.l.], v. 49, p. 217-223, fev. 2018. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.copbio.2017.10.007>.

MATEJČEKOVÁ, Z.; LIPTÁKOVÁ, D.; VALÍK, L. (2017). Functional probiotic products based on fermented buckwheat with Lactobacillus rhamnosus. **Lwt - Food Science And Technology**, [S.l.], v. 81, p. 35-41, ago. 2017. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.lwt.2017.03.018>.

MAY, J. M.; QU, Z. (2005). Transport and intracellular accumulation of vitamin C in endothelial cells: relevance to collagen synthesis, *Archives of Biochemistry and Biophysics*, v. 434, n. 1, 2005, p. 178-186, ISSN 0003-9861, <https://doi.org/10.1016/j.abb.2004.10.023>.

METSÄMUURONEN, S.; NYSTRÖM, M. (2009). Enrichment of  $\alpha$ -lactalbumin from diluted whey with polymeric ultrafiltration membranes. **Journal Of Membrane Science**, [S.l.], v. 337, n. 1-2, p. 248-256, jul. 2009. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.memsci.2009.03.052>.

MONGKOLTHANARUK, W.; COOPER, G. R.; MAWER, J. S. P.; ALLAN, R. N.; MOIR, A. (2011). Effect of Amino Acid Substitutions in the GerAA Protein on the Function of the Alanine-Responsive Germinant Receptor of *Bacillus subtilis* Spores. **Journal Of Bacteriology**, [S.l.], v. 193, n. 9, p. 2268-2275, maio 2011. American Society for Microbiology. <http://dx.doi.org/10.1128/jb.01398-10>.

POSSEMIERS, S.; MARZORATI, M.; VERSTRAETE, W.; WIELE, T. (2010). Bacteria and chocolate: a successful combination for probiotic delivery. **International Journal Of Food Microbiology**, [S.l.], v. 141, n. 1-2, p. 97-103, 30 jun. 2010. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2010.03.008>.

RAIZEL, R.; SANTINI, E.; KOPPER, A. M.; REIS FILHO, A. D. (2011). Efeitos do consumo de probióticos, prebióticos e simbióticos para o organismo humano. **Revista Ciência & Saúde**, Porto Alegre, v. 4, n. 2, p. 66-74, 2011.

RIBEIRO, P. F. A.; STRINGHETA, P. C.; OLIVEIRA, E. B.; MENDONÇA, A. C.; SANT'ANA, H. M. P. (2015). Teor de vitamina C,  $\beta$ -caroteno e minerais em camu-camu cultivado em diferentes ambientes. **Ciência Rural**, [S.l.], v. 46, n. 3, p. 567-572, 30 nov. 2015. FapUNIFESP (SciELO). <http://dx.doi.org/10.1590/0103-8478cr20150024>.

ROWE, R. C.; SHESKEY, P. J.; QUINN, M. E. (2009). **Handbook of pharmaceutical excipients**. 6<sup>a</sup> ed. 2009.

RUFINO, M. S. M.; ALVES, R. E.; FERNANDES, F. A. N.; BRITO, E. S. (2011). Free radical scavenging behavior of ten exotic tropical fruits extracts. **Food Research International**, [S.l.], v. 44, n. 7, p. 2072-2075, ago. 2011. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodres.2010.07.002>.

SMITHERS, G. W. (2008). Whey and whey proteins—From ‘gutter-to-gold’. **International Dairy Journal**, [S.l.], v. 18, n. 7, p. 695-704, jul. 2008. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.idairyj.2008.03.008>.

YUYAMA, K.; AGUIAR, J. P. L.; YUYAMA, L. K. O. (2002). Camu-camu: um fruto fantástico como fonte de vitamina c1. **Acta Amazonica**, [S.l.], v. 32, n. 1, p. 169-174, mar. 2002. FapUNIFESP (SciELO). <http://dx.doi.org/10.1590/1809-43922002321174>.

ZANATTA, C; MERCADANTE, A. (2007). Carotenoid composition from the Brazilian tropical fruit camu-camu (*Myrciaria dubia*). **Food Chemistry**, [S.l.], v. 101, n. 4, p. 1526-1532, 2007. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2006.04.004>.