



UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS
DEPARTAMENTO DE ENGENHARIA DE ALIMENTOS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE
ALIMENTOS

BIANCA MARA REGES

SUCO DE AÇAÍ FUNCIONAL: ESTABILIDADE, PROCESSAMENTO, DIGESTÃO
E FERMENTAÇÃO PELA MICROBIOTA INTESTINAL HUMANA

FORTALEZA

2024

BIANCA MARA REGES

SUCO DE AÇAÍ FUNCIONAL: ESTABILIDADE, PROCESSAMENTO, DIGESTÃO E
FERMENTAÇÃO PELA MICROBIOTA INTESTINAL HUMANA

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, da Universidade Federal do Ceará, como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutora em Ciência e Tecnologia de Alimentos. Área de concentração: Ciência e Tecnologia de Alimentos.

Orientador: Prof^ª. Dra. Sueli Rodrigues.

FORTALEZA

2024

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
Universidade Federal do Ceará
Sistema de Bibliotecas

Gerada automaticamente pelo módulo Catalog, mediante os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

- R258s Reges, Bianca Mara.
Suco de açaí funcional: estabilidade, processamento, digestão e fermentação pela microbiota intestinal humana / Bianca Mara Reges. – 2024.
112 f. : il. color.
- Tese (doutorado) – Universidade Federal do Ceará, Centro de Ciências Agrárias, Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, Fortaleza, 2024.
Orientação: Profa. Dra. Sueli Rodrigues.
1. Simbiótico. 2. Ultrassom de alta intensidade. 3. Bifidobacterium breve. 4. Microbiota intestinal. 5. Metabólitos. I. Título.

CDD 664

BIANCA MARA REGES

SUCO DE AÇAÍ FUNCIONAL: ESTABILIDADE, PROCESSAMENTO, DIGESTÃO E
FERMENTAÇÃO PELA MICROBIOTA INTESTINAL HUMANA

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de alimentos, do Centro de Ciências Agrárias, da Universidade Federal do Ceará, como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor em Ciência e Tecnologia de Alimentos. Área de concentração: Ciência e Tecnologia de Alimentos.

Aprovada em 19/04/2024.

BANCA EXAMINADORA

Documento assinado digitalmente
 SUELI RODRIGUES
Data: 19/08/2024 20:30:50-0300
Verifique em <https://validar.itl.gov.br>

Prof.^a Dra. Sueli Rodrigues (Orientadora)
Universidade Federal do Ceará (UFCE)
Documento assinado digitalmente

 THATYANE VIDAL FONTELES
Data: 20/08/2024 14:31:23-0300
Verifique em <https://validar.itl.gov.br>

Dra. Thatyane Vidal Fonteles
Universidade Federal do Ceará (UFC)
Documento assinado digitalmente

 MARIA CRISTIANE RABELO
Data: 21/08/2024 09:36:12-0300
Verifique em <https://validar.itl.gov.br>

Dra. Maria Cristiane Rabelo
Universidade Federal do Ceará (UFC)
Documento assinado digitalmente

 MAYRA GARCIA MAIA COSTA
Data: 21/08/2024 08:48:37-0300
Verifique em <https://validar.itl.gov.br>

Dra. Mayra Garcia Maia Costa
Núcleo de Tecnologia e Qualidade Industrial do Ceará (NUTEC)
Documento assinado digitalmente

 TIAGO LIMA DE ALBUQUERQUE
Data: 19/08/2024 17:52:58-0300
Verifique em <https://validar.itl.gov.br>

Prof. Dr. Tiago Lima de Albuquerque
Universidade Federal do Ceará (UFC)

À Deus, minha mãe Luiza, meu pai Helder (*in
memoriam*), meu irmão Jonas e meu esposo
Herleson.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus por sua infinita bondade e pelo dom da vida, por ter me proporcionado caminhos de sabedoria e persistência para realizar esta pesquisa tão especial, por confiar nas minhas escolhas e me acompanhar diariamente.

Agradeço a minha mãe, Luiza de Marilac Reges, que sempre me apoiou e me ajudou nos meus estudos. Sua coragem, força e humildade são exemplos na minha caminhada. Obrigada por me proteger da sua forma com muito amor e carinho.

Agradeço ao meu esposo José Herleson Maia pelo amor, companheirismo, carinho, ajuda, paciência e cuidado que têm e teve comigo durante toda essa trajetória, sempre me motivando e me incentivando a seguir meus objetivos e me apoiando nos momentos mais difíceis. Sua companhia e positividade são realmente um milagre no coração da ansiedade. Te amo por isso.

Agradeço demais ao meu irmão Jonas Platini Reges por sempre me desafiar a ser cada vez melhor, é sempre uma inspiração ver sua inteligência, trajetória e conquistas e sua persistência em abraçar as oportunidades. Isso me alegra e me motiva a crescer também dentro dos meus limites.

Agradeço as minhas amigas Joyciane da Silva Gomes, Lidene Girão Rabelo de Oliveira e Vandersonia Maria de Sousa Oliveira, que são exemplos de uma amizade sem tamanho, mostrando que as pessoas mais diferentes podem se tornar as mais próximas. Obrigada por me inspirarem com suas histórias.

Agradeço as minhas tias Rosa Maria Reges e Luzia de Fátima Reges por sempre estarem presentes na minha vida. Como segundas mães, são protetoras, mimadoras e fortes. Obrigada por contribuírem para o meu crescimento pessoal e profissional, servindo de inspiração em diversos aspectos da minha vida.

Agradeço de forma muito carinhosa a minha gatinha superprotetora Raimunda Gerliane Reges Maia, que é muito fofa e peluda, tem uma cara de “poucos amigos”, mas no fundo tem um coração enorme. Seu companheirismo é tranquilizante.

Agradeço aos membros do Labiotec (Laboratório de Biotecnologia), Betina, Brenda, Cristiano, Eciângela, Elaine, Fátima, Karol, Rhonyele, Sannara e Thaiz por me

receberem com prazer no laboratório, me ajudarem nas minhas dúvidas e problemas, e pela companhia em todos os momentos.

Agradeço a Dra. Thatyane Vidal Fonteles, que me auxiliou nos experimentos e escrita dos artigos em inglês, tirando minhas dúvidas, corrigindo, sugerindo melhorias e contribuindo na construção do trabalho final.

Agradeço a minha orientadora Prof^a. Dra. Sueli Rodrigues pela sua orientação e dedicação a minha pesquisa durante esses quatro anos de doutorado, contribuindo de forma valiosa para a realização do presente trabalho. Sempre estive muito próxima das etapas da pesquisa, resolvendo problemas, trazendo ideias e contribuindo com melhorias. Sua responsabilidade, dedicação, presença e inteligência são admiráveis.

Agradeço a Universidade Federal do Ceará (UFC) *campus* do Pici, pela estrutura concedida para a realização deste trabalho.

O presente trabalho foi realizado com o apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001.

Agradeço à CAPES pela concessão da bolsa de doutorado. E às agências de fomento: Fundação Cearense de Apoio ao Desenvolvimento Científico e Tecnológico (FUNCAP) e Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelo apoio financeiro para a realização da presente pesquisa.

“A vida é uma questão. O amor é uma resposta”
(Padre Zezinho)

RESUMO

O presente estudo se divide em duas etapas. A primeira etapa aborda a elaboração do suco de açaí contendo glico-oligossacarídeos e dextrana processado por ultrassom de alta intensidade. Na segunda etapa, foi avaliada a estabilidade do suco de açaí contendo glico-oligossacarídeos e dextrana fermentado com *Bifidobacterium breve* NRRL B-41408 armazenado por 42 dias a 4 °C. Os sucos prebiótico e simbiótico foram submetidos a digestão simulada *in vitro* e avaliados quanto ao seu impacto na microbiota intestinal humana. O suco prebiótico não-sonicado apresentou em sua composição glicose (16,55 g/L), frutose (27,59 g/L), glico-oligossacarídeos (82,56 g/L) e dextrana (23,30 g/L). Após o processamento, os glico-oligossacarídeos e a dextrana do suco prebiótico sonicado (373 W/cm²; 9 min; 25 °C) apresentaram concentração de 77,82 e 23,12 g/L, respectivamente, e resistiram à digestão simulada *in vitro*, promovendo o aumento de ácidos graxos de cadeia curta (AGCC), principalmente o ácido propiônico. O suco sonicado aumentou a abundância relativa das famílias *Rikenellaceae* e *Acidaminocaccaceae* após a fermentação fecal, além de melhorar a riqueza e diversidade da microbiota avaliada. No suco de açaí simbiótico, a contagem de células viáveis de *B. breve* foi de 9,0 log UFC/mL após a fermentação e durante o armazenamento refrigerado (42 dias), indicando que *B. breve* manteve seu metabolismo em baixas temperaturas e em condições ácidas. Os glico-oligossacarídeos e a dextrana do suco simbiótico apresentaram resistência à digestão simulada *in vitro* e promoveram a produção de AGCC, principalmente os ácidos acético, propiônico e isobutírico. O suco de açaí simbiótico melhorou a diversidade de espécies e reduziu a abundância de espécies associadas com a síndrome do intestino irritável e o desequilíbrio da microbiota intestinal. Ambos os sucos de açaí produzidos podem contribuir para a melhora da saúde geral do hospedeiro, por meio do aumento de bactérias benéficas, equilíbrio da microbiota intestinal e produção de metabólitos, como os AGCC. Além disso, os sucos desenvolvidos podem ser considerados alimentos funcionais e veículos não lácteos adequados para *B. breve*, glico-oligossacarídeos e dextrana.

Palavras-chave: simbiótico; ultrassom de alta intensidade; *Bifidobacterium breve*; microbiota intestinal; metabólitos.

ABSTRACT

The present study is divided into two stages. The first stage addresses the preparation of açai juice containing gluco-oligosaccharides and dextran processed by high-intensity ultrasound. In the second stage, the stability of açai juice containing gluco-oligosaccharides and dextran fermented with *Bifidobacterium breve* NRRL B-41408, stored for 42 days at 4°C, was evaluated. The prebiotic and synbiotic juices were subjected to *in vitro* simulated digestion and evaluated for their impact on human gut microbiota. The non-sonicated prebiotic juice contained glucose (16.55 g/L), fructose (27.59 g/L), gluco-oligosaccharides (82.56 g/L), and dextran (23.30 g/L). After processing, the gluco-oligosaccharides and dextran in the sonicated prebiotic juice (373 W/cm²; 9 min; 25°C) had concentrations of 77.82 and 23.12 g/L, respectively, and resisted *in vitro* simulated digestion, promoting an increase in short chain fatty acids (SCFAs), mainly propionic acid. The sonicated juice increased the relative abundance of the *Rikenellaceae* and *Acidaminococcaceae* families after fecal fermentation, as well as improved the richness and diversity of the microbiota evaluated. In the synbiotic açai juice, the viable cell count of *B. breve* was 9.0 log CFU/mL after fermentation and during refrigerated storage (42 days), indicating that *B. breve* maintained its metabolism at low temperatures and under acidic conditions. The gluco-oligosaccharides and dextran in the synbiotic juice exhibited resistance to *in vitro* simulated digestion and promoted the production of SCFAs, mainly acetic, propionic, and isobutyric acids. The synbiotic açai juice improved species diversity and reduced the abundance of species associated with irritable bowel syndrome and intestinal microbiota imbalance. Both açai juices produced may contribute to improving the host's overall health by increasing beneficial bacteria, balancing the intestinal microbiota, and producing metabolites such as SCFAs. Additionally, the developed juices can be considered functional foods and suitable non-dairy carriers for *B. breve*, gluco-oligosaccharides and dextran.

Keywords: synbiotic; high-intensity ultrasound; *Bifidobacterium breve*; gut microbiota; metabolites.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1	- Reação do acceptor para a síntese dos oligossacarídeos prebióticos.	23
Figura 2	- Cachos de açaí (<i>Euterpe oleracea</i> Mart.).	27
Figura 3	- Cavitação induzida por ultrassom.....	31
Figura 4	- Fluxograma de elaboração dos sucos funcionais SAP-US (A) e SAS (B).	37
Figura 5	- Síntese de glico-oligossacarídeos em suco de açaí.....	38
Figura 6	- Desruptor de células ultrassônico.	39
Figura 7	- Suco de açaí simbiótico armazenado a 4 °C.	41
Figura 8	- Detecção de glico-oligossacarídeos em suco de açaí por Cromatografia em Camada Delgada.	49
Figura 9	- Concentração relativa (%) do grau de polimerização (GP) dos glico- oligossacarídeos (GP) durante a digestão simulada <i>in vitro</i> e fermentação fecal de SAP (A) e SAS-US (B).	52
Figura 10	- Concentração de dextrana (g/L) durante a digestão simulada <i>in vitro</i> e fermentação fecal de SAP e SAP-US.	53
Figura 11	- Concentração de açúcares redutores (g/L) durante a digestão simulada <i>in vitro</i> e fermentação fecal do suco de açaí prebiótico SAP (A) e SAP- US (B).	55
Figura 12	- Concentração relativa de compostos fenólicos totais (%) durante a digestão simulada <i>in vitro</i> e fermentação fecal de suco de açaí prebiótico SAP e SAP-US.....	57
Figura 13	- Concentração relativa de ácido ascórbico (%) durante a digestão simulada <i>in vitro</i> e fermentação fecal de sucos SAP e SAP-US.....	58
Figura 14	- Ácidos orgânicos e ácidos graxos de cadeia curta (g/L) durante a fermentação fecal de suco de açaí prebiótico SAP (A) e SAP-US (B).....	60

Figura 15	- Abundância relativa (%) da microbiota fecal no nível taxonômico de Filo antes e depois da fermentação do suco de açaí prebiótico SAP (A) e SAP-US (B).	62
Figura 16	- Abundância relativa (%) da microbiota fecal no nível taxonômico de Família antes e depois da fermentação do suco de açaí prebiótico SAP (A) e SAP-US (B).	63
Figura 17	- Estimativa do índice de Chao1 (A) e Shannon (B) para espécies bacterianas antes e após fermentação fecal de suco de açaí prebiótico SAP e SAP-US.	66
Figura 18	- Concentração de ácido lático e ácidos graxos de cadeia curta (g/L), pH e viabilidade de <i>B. breve</i> NRRL B-41408 no SAS durante a fermentação (22h/37 °C) e armazenamento (4 °C).	67
Figura 19	- Concentração de açúcares (g/L), pH e viabilidade de <i>B. breve</i> NRRL B-41408 no SAS durante a fermentação (22h/37 °C) e armazenamento (4 °C).	68
Figura 20	- Concentração relativa de cada grau de polimerização (GP) dos glico-oligossacarídeos no SAS durante a fermentação (37 °C) e o armazenamento a 4°C.	69
Figura 21	- Grau de polimerização (GP) dos glico-oligossacarídeos em placa de cromatografia em camada delgada do SAS durante a fermentação (37 °C) e o armazenamento a 4°C.	70
Figura 22	- Viabilidade de <i>B. breve</i> NRRL B-41408 em SAS durante a digestão simulada <i>in vitro</i> nos dias 0 e 42 do armazenamento a 4 °C.	74
Figura 23	- Grau de polimerização (GP) dos glico-oligossacarídeos em placa de cromatografia de camada delgada em SAS durante a digestão simulada <i>in vitro</i> nos dias 0 e 42 do armazenamento a 4 °C.	76
Figura 24	- Concentração de dextrana (g/L) em SAS durante a digestão simulada <i>in vitro</i> nos dias 0 e 42 do armazenamento a 4 °C.	77

Figura 25	- Concentração relativa (%) de glicose, frutose, glico-oligossacarídeos e dextrana durante a fermentação fecal (doadores A, B, C e D) do SAS digerido nos dias 0 e 42 do armazenamento a 4 °C.....	78
Figura 26	- Concentração de ácidos orgânicos e ácidos graxos de cadeia curta (g/L) durante a fermentação fecal (doadores A, B, C e D) do SAS digerido nos dias 0 e 42 do armazenamento a 4 °C.	80
Figura 27	- Abundância relativa (%) da microbiota intestinal de quatro doadores (A, B, C e D) em nível taxonômico de família antes e após a fermentação fecal do suco de açaí potencialmente simbiótico digerido nos dias 0 e 42 do armazenamento a 4 °C.....	82
Figura 28	- Análise de componentes principais na avaliação dos efeitos do SAS digerido antes (0h) e após a fermentação (48h) de espécies da microbiota intestinal de quatro doadores (A, B, C e D).	84
Figura 29	- Espécies observadas e índices de Chao1, Shannon e Simpson da microbiota intestinal de quatro doadores (A, B, C e D) em nível taxonômico de família antes (0h) e após (48h) a fermentação fecal do SAS digerido nos dias 0 e 42 do armazenamento a 4 °C.....	86
Figura 30	- Crescimento semi-dinâmico (A) e estático (B) de <i>Lacticaseibacillus casei</i> em suco de açaí prebiótico durante a fermentação após a digestão simulada <i>in vitro</i>	104
Figura 31	- pH do crescimento semi-dinâmico e estático de <i>Lacticaseibacillus casei</i> em suco de açaí prebiótico durante a fermentação após a digestão simulada <i>in vitro</i>	105
Figura 32	- Concentração de carboidratos e ácidos no suco de açaí potencialmente simbiótico sonificado por 3 min (A), 6 min (B) e 9 min (C) durante o armazenamento a 4 °C.....	108
Figura 33	- Viabilidade de <i>B. breve</i> NRRL B-41408 em suco de açaí potencialmente simbiótico sonificado por 3, 6 e 9 min durante o armazenamento a 4 °C. ...	109

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	- Composição de carboidratos nos sucos SAP e SAP-US.	50
Tabela 2	- Teste de viabilidade de <i>Bifidobacterium breve</i> NRRL B-41408 no meio bifidobacterium.	106

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AGCC	Ácidos graxos de cadeia curta
BAL	Bactérias ácido-láticas
CAPES	Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior
CEP	Comitê de Ética em Pesquisa
CONAB	Companhia Nacional do Abastecimento
EMATERCE	Empresa de Assistência Técnica e Extensão Rural do Ceará
IBGE	Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
FOS	Fruto-oligossacarídeos
GOS	Galacto-oligossacarídeos
GP	Grau de Polimerização
IMOS	Isomalto-oligossacarídeos
MOS	Mano-oligossacarídeos
SAP	Suco de açaí potencialmente prebiótico
SAP-US	Suco de açaí potencialmente prebiótico sonicado
SAS	Suco de açaí potencialmente simbiótico
TCLE	Termo de Consentimento Livre e Esclarecido
UFC	Universidade Federal do Ceará
TGI	Trato Gastrointestinal
TLC	<i>Thin Layer Chromatography</i>
XOS	Xilo-oligossacarídeos

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	17
2	OBJETIVO GERAL	19
2.1	Objetivos específicos	19
3	REFERENCIAL TEÓRICO	20
3.1	Alimentos funcionais	20
3.2	Prebióticos, probióticos e simbióticos	21
3.2.1	<i>Prebióticos</i>	21
3.2.2	<i>Probióticos</i>	23
3.2.3	<i>Simbióticos</i>	25
3.3	Açaí (<i>Euterpe oleracea</i> Mart.).....	27
3.4	Tecnologia ultrassônica	30
3.5	Digestão simulada <i>in vitro</i>	32
3.6	Microbiota intestinal humana	34
4	MATERIAL E MÉTODOS	36
4.1	Polpa de açaí.....	36
4.2	Produção da enzima dextrana-sacarase	36
4.3	Testes preliminares	36
4.4	Desenvolvimento dos sucos funcionais.....	36
4.5	Preparo do suco de açaí prebiótico	38
4.6	Processamento ultrassônico	39
3.5.1	<i>Cálculo da intensidade da energia ultrassônica</i>	39
3.6	Preparo do suco açaí simbiótico (SAS)	40
3.7	Armazenamento do suco de açaí simbiótico.....	40
3.8	Viabilidade de <i>Bifidobacterium breve</i> NRRL B-41408	41

3.9	Digestão simulada <i>in vitro</i>	42
3.10	Inóculo fecal	43
3.11	Fermentação pela microbiota intestinal	43
3.12	Determinações analíticas.....	44
3.12.1	<i>Atividade enzimática da dextrana-sacarase</i>	44
3.12.2	<i>Análise de dextrana produzida durante a síntese enzimática no suco</i>	45
3.12.3	<i>Análise do grau de polimerização dos glico-oligossacarídeos</i>	45
3.12.4	<i>Quantificação de açúcares redutores, ácidos orgânicos e ácidos graxos de cadeia curta</i>	46
3.12.5	<i>Quantificação de compostos fenólicos totais</i>	46
3.12.6	<i>Extração do DNA e sequenciamento do gene 16 rRNA</i>	47
3.13	Análise estatística.....	47
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	48
5.1	Suco de açaí contendo glico-oligossacarídeos e dextrana (SAP)	48
5.1.1	<i>Síntese de glico-oligossacarídeos em suco de açaí</i>	48
5.1.2	<i>Consumo de carboidratos durante a digestão simulada in vitro e fermentação fecal dos sucos SAP e SAP-US</i>	51
5.1.3	<i>Bioacessibilidade de compostos fenólicos totais e ácido ascórbico do suco de açaí prebiótico</i>	56
5.1.4	<i>Produção de ácidos orgânicos e AGCC na fermentação fecal dos sucos SAP e SAP-US</i>	59
5.1.5	<i>Análises da microbiota fecal da fermentação do suco de açaí prebiótico</i>	61
5.1.5.1	<i>Abundância relativa</i>	61
5.1.5.2	<i>Diversidade e riqueza de espécies</i>	65
5.2	Suco de açaí potencialmente simbiótico (SAS)	67
5.2.1	<i>Fermentação do suco de açaí prebiótico (SAP) por B. breve NRRL B-41408</i> ...67	
5.2.2	<i>Estabilidade do SAS durante o armazenamento refrigerado</i>	70

5.2.3	<i>Viabilidade de B. breve NRRL B-41408 durante a digestão simulada in vitro..</i>	73
5.2.4	<i>Fermentação do SAS com inóculo fecal.....</i>	77
5.2.4.1	<i>Consumo de açúcares</i>	77
5.2.4.2	<i>Produção de ácidos orgânicos e ácidos graxos de cadeia curta</i>	79
5.2.4.3	<i>Abundância relativa.....</i>	81
5.2.4.4	<i>Diversidade e riqueza de espécies.....</i>	84
6	CONCLUSÃO.....	88
	REFERÊNCIAS	89
	APÊNDICE A - RESISTÊNCIA DE <i>Lactocaseibacillus casei</i> EM SUCO AÇAÍ PREBIÓTICO APÓS A DIGESTÃO SIMULADA <i>IN VITRO</i>.....	104
	APÊNDICE B – TEMPO DE ATIVAÇÃO E REPIQUE DE <i>Bifidobacterium breve</i> NRRL B-41408	1066
	APÊNDICE C - SUCO DE AÇAÍ CONTENDO GLICO-OLIGOSSACARÍDEOS E DEXTRANA SONICADO FERMENTADO COM <i>Bifidobacterium breve</i> NRRL B-41408.....	107
	07	
	APÊNDICE D - MODELO DO TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO.....	107

1 INTRODUÇÃO

A ascensão internacional do açaí está sendo bastante significativa nos últimos anos, sendo o Brasil o maior exportador da polpa congelada (COMPANHIA NACIONAL DO ABASTECIMENTO, 2022). Produtos à base de açaí tem expandido o mercado na forma de *snacks* alimentícios, *shakes* energéticos (COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO - CONAB, 2019) e sucos (LEE, 2019). Os sucos de frutas, sejam frescos ou industrializados, estão presentes na dieta da maioria das pessoas devido ao sabor, praticidade e saudabilidade (DO CARMO; DANTAS; RIBEIRO, 2014). O consumo de bebidas açucaradas ou com baixo valor nutricional, como sucos artificiais ou refrigerantes estão associados à presença de adiposidade abdominal excessiva (DA SILVA *et al.*, 2019). Com isso, é relevante o estudo sobre o desenvolvimento de sucos fortificados com ingredientes que promovam benefícios a saúde, como os alimentos funcionais, contribuindo para uma alimentação saudável e balanceada.

A fortificação de sucos de frutas com ingredientes funcionais, tais como prebióticos, probióticos e simbióticos (ALVES FILHO *et al.*, 2018; FREITAS *et al.*, 2021; PEREIRA *et al.*, 2017; SANTOS FILHO *et al.*, 2019) possibilitam a diversificação de produtos no mercado, uma vez que estes ingredientes são comumente adicionados em produtos lácteos (SANTOS *et al.*, 2018). Suco de açaí contendo fruto-oligossacarídeos (FOS) foi fermentado com *Lactocaseibacillus casei* NRRL B-442 e armazenado durante 42 dias sob refrigeração, obtendo-se viabilidade adequada do probiótico para exercer benefícios à saúde durante a vida de prateleira. O prebiótico também demonstrou melhora no crescimento do probiótico (FREITAS *et al.*, 2021). As pesquisas na literatura sobre a utilização de *Bifidobacterium* spp. probióticas na fermentação de suco de açaí são escassas, evidenciando a necessidade de um estudo voltado para as bebidas simbióticas fermentadas com *Bifidobacterium* spp.

Os sucos funcionais, especialmente os prebióticos, podem ser beneficiados com a aplicação de uma ou mais tecnologias não-térmicas (FONTELES; RODRIGUES, 2018). Um estudo que avaliou o processamento por ultrassom de alta intensidade em suco de açaí mostrou que a tecnologia empregada aumenta a estabilidade da bebida e contribui para a preservação dos compostos bioativos (LINHARES *et al.*, 2020; SANÍN; NAVIA; SERNA-JIMÉNEZ, 2020). Em suco de cramberry contendo FOS, a combinação dos processamentos de ultrassom

e alta pressão conservaram os prebióticos apesar das pequenas alterações ocasionadas durante o processamento (GOMES *et al.*, 2017). Mediante os benefícios que o processamento ultrassônico traz para a composição do suco, sugere-se também conhecer de que forma o processamento do suco pode alterar a composição da microbiota intestinal do consumidor no âmbito de melhorar a saúde do hospedeiro.

Existem alguns critérios que devem ser levados em consideração antes de alegar a funcionalidade de um produto, para tanto, são necessários testes *in vivo* e *in vitro* para avaliar os efeitos toxicológicos, a dosagem terapêutica e as propriedades físico-químicas, químicas, sensoriais e, bem como a validade do alimento (GRANATO; NUNES; BARBA, 2017). Os testes de digestão simulada *in vitro* trazem informações sobre a bioacessibilidade de compostos presentes no alimento (CARBONELL-CAPELLA *et al.*, 2014). A digestão simulada também fornece dados sobre a resistência de prebióticos e probióticos incorporados em sucos de frutas quando submetidos às condições intestinais, apontando seus possíveis efeitos benéficos à saúde do hospedeiro (LEITE *et al.*, 2023; SILVA; CAMPELO; RODRIGUES, 2022).

Tendo em vista que o açaí é uma fruta bastante apreciada por suas características nutricionais e funcionais, é viável explorar a fortificação do suco de açaí com carboidratos prebióticos sintetizados diretamente no suco, como os glico-oligossacarídeos e a dextrana, associado ao processamento por ultrassom de alta intensidade. Além disso, faz-se necessário o estudo da bebida simbiótica fermentada com *Bifidobacterium breve* NRRL B-41408 em prol de resultados sobre a viabilidade durante o armazenamento e o efeito na composição da microbiota intestinal humana.

2 OBJETIVO GERAL

Desenvolver sucos funcionais de açaí contendo glico-oligossacarídeos e dextrana fermentados ou não por *Bifidobacterium breve* NRRL B-41408 e avaliar a estabilidade e o efeito do processamento por ultrassom de alta intensidade na fermentação pela microbiota intestinal humana.

2.1 Objetivos específicos

- Sintetizar glico-oligossacarídeos prebióticos no suco de açaí utilizando a enzima dextrana-sacarase;
- Avaliar a integridade dos glico-oligossacarídeos e dextrana durante a digestão simulada *in vitro*;
- Avaliar o efeito do suco de açaí prebiótico processado por ultrassom de alta intensidade na fermentação pela microbiota intestinal humana;
- Avaliar a estabilidade de *B. breve* durante o armazenamento refrigerado do suco de açaí;
- Avaliar o efeito do suco de açaí simbiótico na fermentação pela microbiota intestinal humana.

3 REFERENCIAL TEÓRICO

3.1 Alimentos funcionais

Os alimentos funcionais são aqueles que, além da função básica de nutrir, podem modular positivamente as funções do corpo, melhorando as respostas fisiológicas e prevenindo algumas doenças ou complicações de saúde. Os compostos funcionais dos alimentos podem atuar como substrato no metabolismo da microbiota intestinal (FARAG *et al.*, 2020). Kebouchi *et al.* (2020) relatam que os probióticos, peptídeos bioativos e compostos fenólicos presentes em matrizes alimentares constituem uma ferramenta valiosa no fortalecimento do muco intestinal.

Pesquisas têm sido realizadas no âmbito da elaboração de alimentos com características funcionais a fim de enriquecer o mercado com produtos de valor nutricional agregado. A utilização de prebióticos, probióticos, simbióticos e bioativos na produção de alimentos funcionais apresenta resultados promissores, melhorando, principalmente, a função terapêutica para o trato gastrointestinal (CHEN; KARBOUNE, 2019).

O interesse dos consumidores e profissionais da saúde por alimentos funcionais é crescente, tendo em vista que estes podem evitar o surgimento de diversas doenças. Dessa forma, as pesquisas buscam explorar os constituintes fitoquímicos de frutas e vegetais a fim de conhecer suas funcionalidades (MAQSOOD *et al.*, 2020). Em suco de açaí, por exemplo, que já possui uma composição rica em antioxidantes, também são realizadas pesquisas de fortificação. Freitas *et al.* (2021) melhoraram a funcionalidade de suco de açaí adicionando fruto-oligossacarídeos e *Lactocaseibacillus casei*, na qual a fermentação com este microrganismo aumentou a concentração de antocianinas e compostos fenólicos da bebida.

O açaí é uma fruta rica em compostos funcionais, como potenciais prebióticos (antocianinas) (MARTINS *et al.*, 2018) e substâncias antioxidantes, contribuindo no tratamento complementar de inflamações no trato gastrointestinal (CURIMBABA *et al.*, 2020). O consumo diário de 200 g da polpa da fruta por mulheres saudáveis pode melhorar o status antioxidante ou pro-oxidante, o que decorre da neutralização dos radicais livres, impedindo o

ataque a outras moléculas e/ou da modulação de enzimas envolvidas no estresse oxidativo (BARBOSA *et al.*, 2016).

Estudos sugerem que dietas maternas hiperlipídicas suplementadas com açaí podem reduzir o acúmulo de gordura hepática, os níveis de colesterol total hepático e o grau de esteatose. Já nos filhos, pode haver redução dos danos hepáticos causados pela dieta materna rica em gordura (BARBOSA *et al.*, 2020). O consumo de polpa de açaí por atletas reduz a peroxidação lipídica e aumenta a capacidade antioxidante sérica (TERRAZAS *et al.*, 2020).

3.2 Prebióticos, probióticos e simbióticos

3.2.1 Prebióticos

A Associação Científica Internacional de Probióticos e Prebióticos revisou e atualizou o conceito de prebiótico, definindo-o como um substrato utilizado seletivamente pelos microrganismos hospedeiros que conferem benefícios a saúde (CUNNINGHAM *et al.*, 2021; GIBSON *et al.*, 2017). A ação benéfica à saúde promovida pelos prebióticos inclui não apenas o efeito no intestino, mas também em outros locais do corpo, como a pele, por exemplo (RAWI *et al.*, 2020).

Para ser classificado como prebiótico, o ingrediente alimentar deve apresentar alguns critérios, tais como: resistir à acidez gástrica e à hidrólise enzimática, ser fermentado pela microbiota intestinal, possuir seletividade para estimular o crescimento de grupos de microrganismos benéficos, conferir benefícios à saúde por meio da microbiota envolvida e dos metabolitos produzidos (BINDELS *et al.*, 2015; GIBSON *et al.*, 2017). A ingestão de prebióticos pode auxiliar na redução do risco de obesidade, mediante a liberação de hormônios gastrointestinais endógenos envolvidos no processo de regulação do apetite (RIVERA-PIZA; LEE, 2020).

O potencial prebiótico de um componente está relacionado principalmente à sua estrutura, variando entre os tipos de carboidratos. Destacam-se entre os oligossacarídeos funcionais, os fruto-oligossacarídeos (FOS), glico-oligossacarídeos (GLOS), galacto-

oligossacarídeos (GOS), mano-oligossacarídeos (MOS), isomalto-oligossacarídeos (IMOS) e xilo-oligossacarídeos (XOS) (KOTHARI; PATEL; GOYAL, 2014).

Os glico-oligossacarídeos, objeto de estudo nesta pesquisa, são oligossacarídeos com 2 a 10 resíduos de glicose e uma ou mais ligações *O*-glicosídicas que apresentam potencial efeito prebiótico devido a sua fermentação seletiva por bactérias intestinais benéficas (ZENG; VAN PIJKEREN; PAN, 2023). A utilização de glico-oligossacarídeos para aumentar a funcionalidade de sucos de frutas tem sido alvo de pesquisas atualmente. Alguns autores verificaram que os glico-oligossacarídeos sintetizados em sucos de acerola e caju foram fermentados por bactérias benéficas, tais como *Lactocaseibacillus casei* NRRL B-442 e *Bifidobacterium breve* NRRL B-41408 (LEITE *et al.*, 2021; NASCIMENTO; SANTOS; RODRIGUES, 2022).

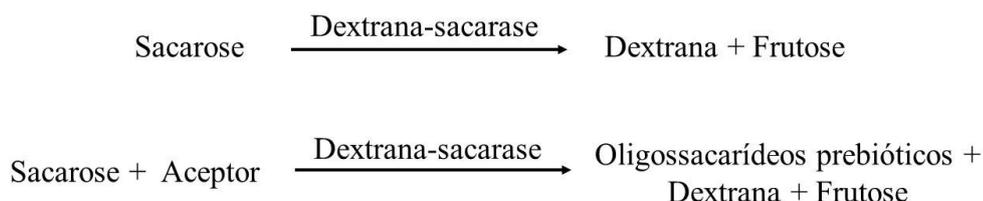
Além das fibras e polissacarídeos da dieta ou derivados sintetizados pelo homem, existem os prebióticos emergentes, que são novos candidatos a prebióticos, sendo eles o leite, polióis, parede celular das plantas, polifenóis, pectina, amido resistente e os prebióticos à base de glicopeptídeos. Constituintes não carboidratos podem ser considerados prebióticos, desde que sua ação seja mediada pelos microrganismos da microbiota intestinal ou probióticos (RAWI *et al.*, 2020). Existem dois mecanismos na qual os prebióticos são utilizados na fermentação da microbiota intestinal. O primeiro é a absorção de todos os componentes da cadeia do prebiótico ou da cadeia mais curta após hidrólise enzimática antes que os derivados sejam transportados para a região citoplasmática. O outro mecanismo é a biossíntese de ácidos graxos de cadeia curta (RAWI *et al.*, 2020).

Os prebióticos podem ser obtidos de três formas diferentes: isolamento de recursos vegetais, produção microbiológica ou síntese enzimática e hidrólise enzimática de polissacarídeos (CRITTENDEN; PLAYNE, 1996; GULEWICZ *et al.*, 2000). A síntese enzimática pode ser realizada diretamente no suco de fruta, reduzindo as etapas de purificação e usando os açúcares naturais da matriz (FONTELES; RODRIGUES, 2018).

A síntese de glico-oligossacarídeos prebióticos utilizando a enzima dextranase é relatada em alguns estudos com sucos de frutas (ALMEIDA *et al.*, 2015; ALVES FILHO *et al.*, 2018; LEITE *et al.*, 2021). Essa enzima catalisa a reação de formação de dextrana e frutose em um meio contendo apenas sacarose como substrato (BARUAH; DEKA; GOYAL, 2017; VANDAMME; SOETAERT, 1995). No entanto, a adição de um carboidrato aceptor, que

pode ser glicose, frutose ou maltose ao meio reacional, contendo também sacarose, promove o desvio das moléculas de glicose para a molécula aceptora, formando os oligossacarídeos prebióticos e dextrana, conforme a Figura 1 (RABELO; FONTES; RODRIGUES, 2009; RODRIGUES; LONA; FRANCO, 2005).

Figura 1 - Reação do acceptor para a síntese dos oligossacarídeos prebióticos.



Fonte: Adaptado de (VERGARA *et al.*, 2010).

3.2.2 Probióticos

Os probióticos são microrganismos vivos que, quando administrados em quantidades adequadas, conferem benefícios à saúde do hospedeiro (CUNNINGHAM *et al.*, 2021), como por exemplo, a modulação do sistema imunológico para o tratamento de câncer (ABDOLALIPOUR *et al.*, 2020; WEN *et al.*, 2020) e melhora da função tireoidiana (TALEBI *et al.*, 2020). Podem atuar na regulação da glicemia pós-prandial, na qual a matriz alimentícia empregada, a cepa probiótica utilizada, os ingredientes incorporados ao produto e a adição de compostos prebióticos à formulação podem impactar nesse efeito (GROM *et al.*, 2020). Atuam também na diminuição dos níveis colesterol no sangue (DEHKOHNEH; JAFARI; FAHIMI, 2019).

Os lactobacilos, bifidobactérias e outras bactérias produtoras de ácido láctico (BAL) têm sido usadas tradicionalmente como probióticos, sendo isoladas principalmente de produtos lácteos fermentados (CUNNINGHAM *et al.*, 2021), no entanto, podem estar presentes em matrizes não lácteas. Abe sato *et al.* (2021) verificaram que a maioria das cepas de BAL recuperadas em frutos de açaí são possíveis candidatos a probióticos, pois possuem resistência a pH baixo e sais biliares, indicando capacidade de resistir a passagem pelo trato gastrointestinal (TGI), são susceptíveis a antibióticos e ausentes de atividade hemolítica e possuem atividade antibacteriana contra *E. coli* e *S. Typhimurium*.

Saracino *et al.* (2020) reportaram que o tratamento das infecções por *H. pylori* utilizando antibiótico pode ser combinado com a administração de probióticos. As cepas de *Lacticaseibacillus casei*, *Lacticaseibacillus paracasei*, *Lactobacillus acidophilus*, *Bifidobacterium lactis* e *Streptococcus thermophilus* possuem ação antagônica em cepa de *H. pylori* e efeito de equilíbrio na disbiose intestinal ocasionada pelos antibióticos. Relatam ainda que estas cinco cepas de probióticos apresentam atividade bactericida e bacteriostática em relação ao *H. pylori*.

Dessa forma, os benefícios dos probióticos ocorrem mediante a capacidade de metabolizar fibras prebióticas ou dietéticas e também à subsequente síntese de metabólitos específicos com propriedades funcionais que geram efeitos benéficos (PEREDO-LOVILLO; ROMERO-LUNA; JIMÉNEZ-FERNÁNDEZ, 2020).

O consumo de cepas de lactobacilos e bifidobactérias tem sido associado a regeneração da barreira intestinal e possuem efeitos antioxidantes e anti-inflamatórios no organismo humano (HERRERA-ROCHA *et al.*, 2023). Experimentos com ratos validaram o efeito de *B. breve* CCFM1369 em inibir o gene chave LDHA e HIF-2 α , diminuindo a capacidade de colonização de *E. coli*, apontando que está cepa pode ser eficiente no tratamento do alívio da colite (GAO *et al.*, 2024). Além disso, as bifidobactérias também podem proteger o organismo contra a infecção respiratória pelo vírus influenza A (HU *et al.*, 2024).

Considerando a importância dos efeitos positivos de cepas de bifidobactérias no organismo humano como probiótico, pesquisas estudam a viabilidade dos probióticos em matrizes alimentares durante o armazenamento refrigerado. A viabilidade de *Bifidobacterium breve* NCIM 5671 em chocolate amargo diminuiu de $10,8 \pm 0,12$ log UFC/g para $9,6 \pm 0,09$ log ufc/g durante o primeiro mês, mas manteve as contagens acima de 9,0 UFC/g até o final do armazenamento a 4 °C (90 dias). Associa-se a manutenção da viabilidade com a presença da manteiga de cacau (ACHI *et al.*, 2024). Em bebida probiótica de soja e de amêndoa, tanto *B. animalis* subsp. *Lactis* quanto *B. longum* mantiveram a viabilidade acima de 7,0 log UFC/mL até o 21º dia de armazenamento a 4 °C, sugerindo que proteínas, fibras alimentares, polifenóis e oligossacarídeos presentes nas bebidas de soja e amêndoa tenham atuado como substratos para o crescimento microbiano durante a fermentação e preservando a viabilidade do primeiro ao último dia de armazenamento (AL ZHRANI; SHORI, 2023).

A sobrevivência dos probióticos em uma matriz alimentar pode ser afetada pela composição físico-química do produto. Soares *et al.* (2019) verificaram que cepas de *Bacillus* com propriedades probióticas tiveram boa capacidade de sobrevivência em requeijão cremoso, suco de laranja e pão caseiro e resistiram as condições gastrointestinais simuladas *in vitro*. Com isso, a elaboração de alimentos funcionais utilizando cepas de *Bacillus* com propriedades probióticas é possível para vários tipos de composição de alimentos.

Freitas *et al.* (2021) utilizaram o probiótico *Lactobacillus casei* NRRL B-442 para fermentar suco de açaí prebiótico, objetivando uma bebida simbiótica. Eles verificaram que o suco de açaí é apto para a produção da bebida simbiótica, na qual o microrganismo probiótico utilizado manteve a viabilidade necessária para gerar benefícios à saúde ao longo de 42 dias sob refrigeração. De acordo com Moreira *et al.* (2017) a adição do probiótico *Lactobacillus rhamnosus* GG em suco misto de juçara e manga ubá torna esse produto um alimento com apelo funcional, tendo em vista que as cepas se mostraram viáveis durante o armazenamento refrigerado do suco.

Além disso, também é relevante destacar a importância da manutenção da viabilidade do probiótico durante a passagem pelo trato gastrointestinal. Alguns autores sugerem que sejam realizados ensaios *in vitro* e *in vivo* para comprovar a eficiência do alimento como veículo de bactérias probióticas no trânsito intestinal humano (CUNNINGHAM *et al.*, 2021; MOREIRA *et al.*, 2017). Durante a passagem pelo trato gastrointestinal, é esperada a redução na contagem de células viáveis, devido o pH baixo, principalmente nas primeiras fases, e a presença de sais biliares tornarem o ambiente desfavorável para a sobrevivência de probióticos (COSTA *et al.*, 2017). No entanto, alguns fatores podem contribuir para melhorar essa sobrevivência dos probióticos, tais como a microencapsulação (KIM *et al.*, 2020; RAJAM; SUBRAMANIAN, 2022) e a presença de glico-oligosacarídeos prebióticos e dextrana (SILVA; CAMPELO; RODRIGUES, 2022).

3.2.3 Simbióticos

Os simbióticos são uma mistura de microrganismos vivos e substratos utilizados seletivamente por esses microrganismos, que conferem benefícios a saúde do hospedeiro (CUNNINGHAM *et al.*, 2021; SWANSON *et al.*, 2020). Os simbióticos podem ser

classificados quanto de natureza complementar ou sinérgica. Os simbióticos complementares são aqueles compostos por uma combinação de um prebiótico e um probiótico, cujos mecanismos de ação podem ser independentes um do outro, e tanto o prebiótico quanto o probiótico devem ter seus próprios benefícios comprovadamente aceitos à saúde. Já os simbióticos sinérgicos contêm um substrato fermentável para o microrganismo vivo coadministrado, onde este substrato e o microrganismo podem ou não ser capazes de provocar um benefício à saúde independentemente um do outro. Neste caso, os componentes individuais não precisam necessariamente ser probióticos ou prebióticos confirmados, porém, eles devem ter um benefício comprovado para a saúde em combinação (CUNNINGHAM *et al.*, 2021). Neste estudo, o simbiótico elaborado foi de natureza complementar.

Pacientes com hipertireoidismo administrados com cápsulas simbióticas (probióticos: *Lacticaseibacillus casei*, *Lactobacillus acidophilus*, *Lacticaseibacillus rhamnosus*, *Lactobacillus bulgaricus*, *Bifidobacterium breve*, *Bifidobacterium longum*, *Streptococcus thermophilus*, prebiótico: fruto-oligossacarídeo) durante oito semanas apresentaram efeitos benéficos na função tireoidiana (TALEBI *et al.*, 2020). Simbiótico contendo *Lacticaseibacillus casei*, *Lactobacillus paracasei*, *Bifidobacterium longum* (DSM-20219), *Bifidobacterium bifidum* e *Bifidobacterium breve* e fibras de marmelo reduziram os efeitos negativos gerados pela realização de exercícios de resistência em experimentos realizados em ratos, produzindo um efeito positivo na manutenção da barreira epitelial e na regulação do stress oxidativo (HERRERA-ROCHA *et al.*, 2023).

Miranda *et al.* (2019) elaboraram um suco simbiótico misto de laranja e hibisco, adicionando-se *Lacticaseibacillus casei* liofilizado e oligofrutose. Os resultados mostraram que é possível produzir um suco simbiótico sem impacto negativo nos parâmetros de qualidade, com viabilidade de sobrevivência do probiótico e boa aceitação sensorial.

De acordo com Li *et al.* (2020), os prebióticos lactitol (LAC) e galacto-oligossacarídeo (GOS) estimularam o crescimento da cepa de *Lacticaseibacillus casei* 28-2, *Lacticaseibacillus casei* 30-1, *Lacticaseibacillus paracasei* 6062 e *Lactiplantibacillus plantarum* 25-1, indicando que um bom produto simbiótico pode ser composto pela combinação de uma ou mais cepas de *Lactobacillus* associada a LAC ou GOS. No entanto, a adição de microcápsulas frescas desse simbiótico no iogurte afetou negativamente as propriedades reológicas e aumentou a sinérese durante o armazenamento, resultado em uma menor vida de prateleira.

3.3 Açaí (*Euterpe oleracea* Mart.)

O açaizeiro (*Euterpe oleracea* Mart.) é uma palmeira nativa da Amazônia brasileira, sendo encontrada principalmente nos estados do Pará, Amapá, Maranhão, Mato Grosso e Tocantins. Sua ocorrência também é verificada em outros países da América do Sul, como Venezuela, Colômbia, Equador, Suriname e Guiana, e na América Central (Panamá). O açaizeiro (Figura 2) é adaptado a condições elevadas de temperatura, precipitação pluviométrica e umidade relativa do ar, na qual a região do estuário do Rio Amazonas possui as maiores e mais densas populações naturais dessa palmeira (NOGUEIRA, 2005).

Figura 2 – Cachos de açaí (*Euterpe oleracea* Mart.).



Fonte: EMATERCE (2022).

Na década de 90, o açaizeiro, que antes era valorizado somente pela produção do palmito a partir da sua palmeira, se transformou em uma importante fonte econômica pela comercialização do seu fruto, o açaí. Impulsionados pela cultura fitness, academia e alimentação saudável, a população passou a consumir o açaí, por este apresentar propriedades antioxidantes e alto teor energético (COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO - CONAB, 2019). O volume de açaí exportado aumentou nos primeiros semestres de 2019 e 2020, cuja exportação é feita para mais de 30 países, sendo os Estados Unidos o principal

importador do açaí brasileiro. Este cenário atual tem incentivado a busca por novos mercados fora do Brasil (COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO - CONAB, 2020). Em 2022, a produção do açaí foi estimada em 1.699.588 toneladas no Brasil (INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA, 2024).

O açaí cresce em cachos por touceiras, onde cada cacho possui algumas centenas de frutos. Quando maduros, possuem coloração roxo-escura, com exceção do açaizeiro do tipo branco, na qual seus frutos são verdes (NOGUEIRA, 2005). Tem forma globosa, medindo aproximadamente 1,3 cm de comprimento e 1,5 cm de diâmetro (ALMEIDA *et al.*, 2011). É rico em antocianinas (CARVALHO *et al.*, 2016), sendo considerado um alimento funcional que colabora na prevenção de doenças crônicas degenerativas (LOBO; VELASQUE, 2016).

O Brasil é o maior produtor, consumidor e exportador de açaí mundialmente (VOZES DA AMAZÔNIA, 2024). De acordo com o IBGE (Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística), em 2022, a produção nacional alcançou 1.699.588 toneladas, na qual o estado do Pará representa o maior produtor de açaí (IBGE, 2024). Estima-se que 60% do açaí produzido no Pará seja destinado ao consumo local e 30% comercializado para outros estados, sobretudo, São Paulo, Rio de Janeiro, Minas Gerais, Ceará e Brasília (TAVARES *et al.*, 2020). Em 2023, mais de 61 mil toneladas de açaí foram exportadas do Pará (G1-PARÁ, 2024). No estado do Ceará, o cultivo de açaí se concentra no município de Quixeré, onde a produção média é de 180 kg por mês, que são transformados em polpa (75 kg) e comercializados por R\$ 20,00/kg (EMATERCE, 2022).

A Instrução Normativa nº 37 de outubro de 2018, do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento – MAPA define açaí como a bebida obtida a partir da parte comestível do fruto extraída com adição de água e filtração, na qual a cor, aroma, sabor característico e quantidade mínima de compostos fenólicos antocianinas sejam preservados. Além disso, o teor mínimo de sólidos totais deve ser 8,0% (BRASIL, 2018).

Os benefícios associados ao consumo de açaí são reportados por alguns autores. De acordo com Song *et al.* (2021), o extrato de açaí rico em antocianinas reduziu a obesidade induzida por uma dieta rica em gordura, resistência à insulina e esteatose hepática, na qual as alterações na microbiota intestinal do hospedeiro são um dos mecanismos potenciais pelo qual o extrato reduz a obesidade e seus distúrbios. A suplementação com açaí associado a exercícios físicos aeróbicos pode mitigar os danos causados por uma dieta rica em gordura melhorar e

função cardíaca. Além disso, os compostos presentes em extratos de açaí foram validados com potencial efeito benéfico na redução dos riscos cardiovasculares (LAVORATO *et al.*, 2021; PONTES *et al.*, 2021).

A ingestão de produtos à base de açaí, combinada a uma dieta balanceada, pode contribuir no tratamento de inflamações intestinais devido à presença de compostos fenólicos, que atuam como antioxidantes, e às fibras alimentares presentes na polpa dessa fruta (CURIMBABA *et al.*, 2020). O açaí possui alto teor de fibras dietéticas solúveis e insolúveis, principalmente arabinose e xilose (RUFINO *et al.*, 2011). Em mulheres aparentemente saudáveis, o consumo de polpa de açaí modulou importantes biomarcadores do processo anti-inflamatório (SOUZA *et al.*, 2021).

Os compostos fenólicos totais presentes no açaí resistem à passagem pelo trato digestivo e atingem o cólon, estimulando o crescimento de bactérias intestinais (ALQURASHI *et al.*, 2017). Estas, por sua vez, produzem ácidos graxos de cadeia curta que possuem efeito protetor contra inflamação intestinal (CURIMBABA *et al.*, 2020).

As antocianinas são os compostos fenólicos predominantes no açaí (PACHECO-PALENCIA; DUNCAN; TALCOTT, 2009). Estes compostos podem contribuir para sobrevivência de cepas de *Lactobacillus* em bebidas (RIBEIRO *et al.*, 2020). LUCIANO *et al.* (2018) verificaram que o *L. acidophilus* LA-3, quando incorporado em smoothie de açaí e banana (80:20 v/v), apresenta boa capacidade de sobrevivência durante o armazenamento refrigerado e sob condições gastrointestinais simuladas por digestão *in vitro*. Os autores relatam, ainda, que o pH mais baixo do smoothie resulta na melhor adaptação do *L. acidophilus* LA-3 as condições de pH do estômago.

Além dos compostos fenólicos do açaí contribuírem para a estabilidade de cepas de *Lactobacillus*, a fermentação do açaí com as bactérias lácticas pode também melhorar a bioacessibilidade de compostos fenólicos. Nascimento *et al.* (2023) relatam que a fermentação de açaí com bactérias lácticas (*Lactobacillus acidophilus*) aumentou a bioacessibilidade de cianidina-3-rutinosídeo em comparação ao suco não fermentado, possibilitando ao consumidor final maiores benefícios a saúde.

O estudo das frutas da Amazônia, especialmente o açaí, é importante para incentivar o desenvolvimento dos produtores locais, atingir mercados internacionais mais amplos e contribuir positivamente nos contextos econômicos e sociais. Também é importante para

diversificar a oferta de novos produtos à base de açaí com alta qualidade, como, por exemplo, sucos funcionais e com vida de prateleira maior.

3.4 Tecnologia ultrassônica

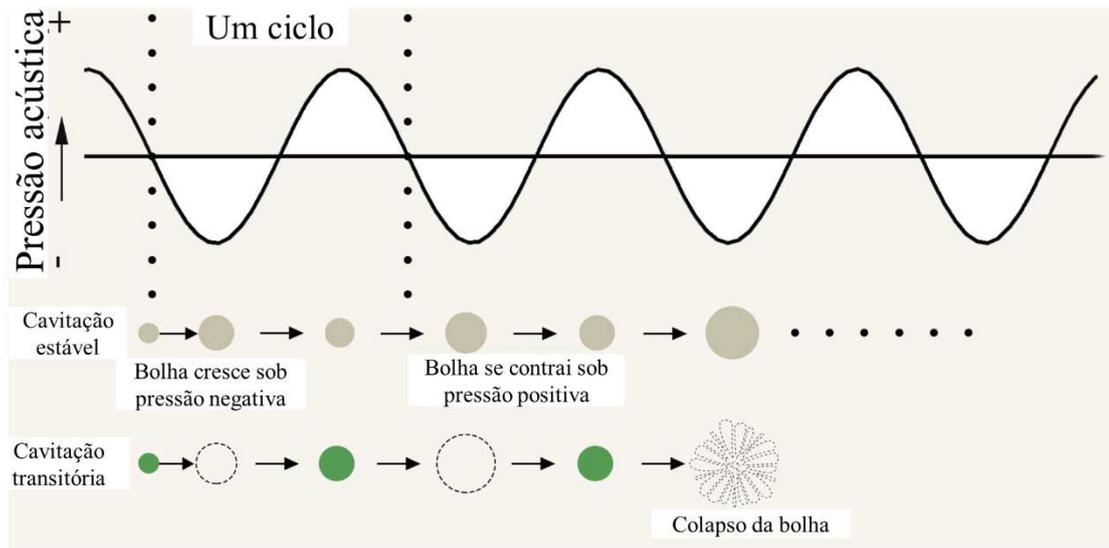
A tecnologia ultrassônica é considerada uma tecnologia verde de processamento não térmico saudável e segura (ZHANG *et al.*, 2023b). Esse processamento chama a atenção para os atributos de qualidade em sucos de frutas, uma vez que melhora a estabilidade de componentes nutricionais durante o armazenamento e aumenta o conteúdo de compostos bioativos (DOLAS; SARAVANAN; KAUR, 2019). A composição bioquímica de sucos de frutas é bastante benéfica para a saúde pelo seu potencial de controlar ou prevenir diversas doenças no corpo humano, e para melhorar ainda mais a funcionalidade dos sucos, o processamento ultrassônico pode ser aplicado para extrair compostos, incluindo polifenóis. No entanto, os efeitos do processamento dependem de fatores como a frequência, amplitude, tempo de processamento e as características da substância processada (GALLO; FERRARA; NAVIGLIO, 2018; ZHANG *et al.*, 2023b).

O ultrassom é definido como ondas sonoras de frequências mais altas, além da faixa audível do homem (RATHNAKUMAR *et al.*, 2023). O ultrassom refere-se a ondas sonoras com frequência superior a 16 kHz e os equipamentos ultrassônicos usam geralmente frequências entre 20 kHz e 10 MHz, sendo classificado em diferentes categorias de acordo com a potência, intensidade, frequência aplicada e aplicação (DOLAS; SARAVANAN; KAUR, 2019). No setor de processamento de alimentos, a aplicação do ultrassom se divide em duas categorias: ultrassom de baixa intensidade e alta frequência (100 kHz-1 MHz, $<10 \text{ W/cm}^2$) e ultrassom de alta intensidade e baixa frequência (20-100 kHz, $10\text{-}1000 \text{ W/cm}^2$) (CUI; ZHU, 2020).

O ultrassom de alta intensidade tem sido utilizado para melhorar bioacessibilidade e a concentração de compostos bioativos (CARVALHO *et al.*, 2020; NASCIMENTO; SANTOS; RODRIGUES, 2022). O ultrassom de alta potência baseia-se no princípio básico de que em intensidades mais altas (baixas frequências) induz a cavitação acústica devido à geração, crescimento e colapso de grandes bolhas, o que provoca a liberação de energias mais altas. A

compressão e a expansão alternadas criam regiões de mudança de pressão, o que resulta no fenômeno de cavitação (DOLAS; SARAVANAN; KAUR, 2019), conforme Figura 3.

Figura 3 - Cavitação induzida por ultrassom.



Fonte: Adaptado de (ZHANG *et al.*, 2023b).

O mecanismo de ação do ultrassom está relacionado com a cavitação, efeitos mecânicos e térmicos (ZHANG *et al.*, 2023b). A interação da energia acústica com um alimento ocorre principalmente através de um meio líquido, uma vez que a cavitação e as ações físicas e químicas induzidas pelo ultrassom desempenham um papel importante nas alterações na qualidade de um alimento durante a sua transformação. A implosão de bolhas cria um substrato incomum para reações químicas, quebrando mecanicamente a membrana das células e melhorando a transferência de material intracelular (GALLO; FERRARA; NAVIGLIO, 2018).

Com base no método de aplicação do ultrassom, existem a sonda e os banhos ultrassônicos. Comparando esses dois sistemas, o ultrassom de sonda é considerado mais eficiente que o banho de ultrassom, pois a intensidade sonora é menor e heterogênea neste último. No entanto, os sistemas de banho de ultrassom são mais econômicos e amplamente utilizados para limpeza de superfícies e solubilização (RATHNAKUMAR *et al.*, 2023). Nesta pesquisa utilizou-se como método de aplicação o ultrassom de sonda.

O processamento por ultrassom de alta intensidade (18 kHz, 373 W/cm²) aumentou a bioacessibilidade de compostos bioativos, como vitamina C e compostos fenólicos em suco de acerola submetido a digestão simulada *in vitro* (NASCIMENTO; SANTOS; RODRIGUES,

2022). Em suco de caju, a concentração de flavonoides amarelos foi aumentada em 33% após o processamento com ultrassom de alta potência (19 kHz, 373 W/cm²) (FONTELES *et al.*, 2021). Um estudo realizado com bagaço de acerola e jambolão mostrou que a utilização de ultrassom de alta intensidade indireto (40 kHz, 100 W de potência) acoplado à agitação mecânica promoveu uma eficiente extração dos polifenóis contidos nesses bagaços. Além disso, o protocolo de extração com ultrassom demonstrou menor impacto ambiental, principalmente devido ao menor tempo de extração e à redução do consumo de energia, quando comparado aos métodos de extração sem ultrassom (DA SILVA; NUNES; HOSKIN, 2023).

Neste estudo, o processamento por ultrassom de alta intensidade foi utilizado no suco de açaí porque melhora a bioacessibilidade de compostos bioativos, como por exemplo as antocianinas e compostos fenólicos. Dessa forma, o objetivo de estudar a aplicação do ultrassom foi avaliar como o suco de açaí prebiótico processado pode alterar a composição da microbiota intestinal humana.

3.5 Digestão simulada *in vitro*

Os estudos de digestão *in vitro*, são modelos que permitem simular o processo de digestão natural e dão informações sobre a liberação e estabilidade de compostos fenólicos (REGINIO *et al.*, 2020), a sobrevivência de probióticos (RIBEIRO *et al.*, 2020) e se um componente tem potencial prebiótico (WEI *et al.*, 2020).

Os modelos de digestão *in vitro* são divididos em estáticos e dinâmicos. Os modelos estáticos compreendem a simulação da cavidade oral, estômago e intestino delgado, porém não produzem as forças mecânicas e as condições dinâmicas que os alimentos passam no sistema digestivo (SENSOY, 2021).

Os modelos dinâmicos apresentam uma estratégia inovadora capaz de fornecer uma simulação mais sofisticada e mais próxima das condições *in vivo* (GONÇALVES; ESTEVINHO; ROCHA, 2021; SENSOY, 2021). Eles podem variar de sistemas simples a multicompartimentais e incorporar os aspectos dinâmicos do processo de digestão, que incluem os fenômenos de cisalhamento, mistura, hidratação ou peristaltismo realizados ao longo do trato gastrointestinal (CARDOSO *et al.*, 2015). O SHIME[®] (*Simulator of the Human Intestinal*

Microbial Ecosystem) representa um modelo de digestão dinâmico, que é controlado por um computador e consiste em cinco compartimentos fechados: o estômago, intestino delgado, cólon ascendente, cólon transversal e o cólon descendente (RODRIGUES *et al.*, 2020).

Existem, ainda, os modelos semi-dinâmicos, desenvolvidos a partir dos modelos de digestão estática (LIU *et al.*, 2019). A digestão semi-dinâmica permite o controle do pH, temperatura e tempo de residência, mimetizando as distintas condições gástricas e intestinais *in vivo* (ALMADA-ÉRIX *et al.*, 2021).

Os modelos de digestão *in vitro* são controlados por meio do ajuste do pH, adição de enzimas digestivas e sais biliares em concentração adequada, controle da temperatura a 37 °C, tempo de digestão, entre outros fatores. Dessa forma, é possível simular as fases gástrica, entérica I e entérica II (REGINIO *et al.*, 2020; RIBEIRO *et al.*, 2020).

Carvalho *et al.* (2020) estudaram a bioacessibilidade de compostos bioativos de suco de açaí processado por ultrassom de alta densidade energética. Os testes foram realizados por meio de modelo de digestão simulada *in vitro*. Os resultados mostraram que a concentração de antocianinas presentes no suco de açaí reduziu durante a fase gástrica, com manutenção da concentração na fase entérica. O tratamento com ultrassom de alta densidade energética melhora a bioacessibilidade de compostos bioativos do suco de açaí.

A juçara, fruta do mesmo gênero do açaí, foi utilizada na formulação de uma bebida mista probiótica, juntamente com morango e banana. A simulação *in vitro* das condições gastrointestinais mostrou que os probióticos *L. casei* e *L. plantarum* sofrem lesão em suas células quando submetidas ao pH ácido da fase gástrica, mas que se recuperam na fase entérica. Contudo, a resistência dessas bactérias ao trato gastrointestinal diminuiu em função do tempo de armazenamento da bebida. Na bebida com *L. plantarum* armazenada por 90 dias, foi verificada uma redução populacional de 6 log UFC/mL ao final da digestão *in vitro* (RIBEIRO *et al.*, 2020).

A simulação das condições gastrointestinais foi utilizada para avaliar a viabilidade celular de culturas probióticas. Os autores observaram que durante a passagem pelo trato digestivo *in vitro*, as culturas probióticas liofilizadas com β -glucanos de leveduras (Y β G) apresentaram menor diminuição na contagem de células viáveis comparadas com as cepas controle – sem Y β G. Dessa forma, β -glucanos de leveduras possuem ação crioprotetora de lactobacilos probióticos (GUEDES *et al.*, 2019).

3.6 Microbiota intestinal humana

A microbiota intestinal é um ecossistema dinâmico e complexo, composto por diferentes microrganismos, tais como bactérias, fungos, vírus, arqueas e protozoários (ZHANG *et al.*, 2023a). As bactérias correspondem a maior parte da microbiota, sendo classificadas em filo, ordem, classe, família, gênero e espécie. A maior parte das bactérias pertencem aos filos *Firmicutes* e *Bacteroidetes* (90%), seguidos de *Actinobacterias* e *Proteobacterias* (MOHAJERI *et al.*, 2018). Os microrganismos intestinais coevoluem com o hospedeiro que fornece a eles um ambiente estável, ao mesmo tempo em que estes microrganismos participam de uma variedade de processos metabólicos, que incluem a digestão e a fermentação dos alimentos (WALSH *et al.*, 2023).

As diferentes interações entre a microbiota e seu hospedeiro tem atraído o interesse para possíveis prevenções de doenças que podem ser evitadas ou controladas por meio da modulação da microbiota intestinal. Estudos mostram que um desbalanço da microbiota intestinal está associado com uma variedade de doenças, como síndrome do intestino irritável, doença celíaca, diabetes tipo 2, hipertensão e obesidade (JACOBS *et al.*, 2023; MARCHESI *et al.*, 2016; NASERI *et al.*, 2023). Cui *et al.* (2024) sugerem que as terapias associadas a microbiota intestinal ou aos metabólitos associados, tais como transplante de microbiota fecal, probióticos e intervenções dietéticas, podem auxiliar na recuperação de pacientes após lesão medular, uma vez que atuam modulando a composição da microbiota intestinal, que por sua vez, pode atuar nos neurônios centrais.

A modulação da microbiota intestinal pode ser alcançada por meio da dieta, com o consumo de alimentos fermentados, probióticos, prebióticos e/ou simbióticos (LEITE *et al.*, 2023; SILVA; CAMPELO; RODRIGUES, 2022). A composição da dieta é o fator mais importante que influencia nas diferenças individuais da microbiota intestinal. No entanto, a genética e as variações fisiológicas também desempenham um papel importante na determinação do microbioma, porém ambos ainda são pouco compreendidos (LIU *et al.*, 2024). Atualmente, os consumidores se preocupam muito com a composição do alimento que estão consumindo e demandam por produtos menos inflamatórios, práticos e que promovam algum benefício a mais para a saúde. Dessa forma, a indústria de alimentos tem pesquisado o segmento

de alimentos funcionais que proporcionem a modulação e o equilíbrio da microbiota intestinal com a promoção de metabólitos que possam atuar na redução de certas doenças.

Os metabólitos produzidos pela microbiota intestinal humana incluem os ácidos graxos de cadeia curta, ácidos biliares secundários, trimetilamina, lipopolissacarídeos, ácido imidazopropiônico, aminoácidos de cadeia ramificada e indol e seus derivados (AGUS; CLÉMENT; SOKOL, 2021). Os AGCC são os metabólitos produzidos pela microbiota principalmente a partir da fermentação de carboidratos indigeríveis (ZHANG *et al.*, 2023a). Esses compostos desempenham papel importante na regulação de diversas funções biológicas, participando na manutenção da integridade da barreira intestinal, melhorando o metabolismo lipídico e regulando o sistema imune e as respostas inflamatórias (AGUS; CLÉMENT; SOKOL, 2021).

Estudos mostram que ingredientes probióticos e prebióticos podem ser utilizados na elaboração de alimentos funcionais, alterando a composição da microbiota intestinal e trazendo benefícios a saúde do hospedeiro. O suco de lichia probiótico (*Lacticaseibacillus casei*) aliviou a disfunção imunológica e modulou a microbiota intestinal pelo aumento da abundância relativa de bactérias benéficas (*Faecalibaculum*, *Lactobacillus* e *Akkermansia*) em camundongos induzidos por ciclofosfamida (WEN *et al.*, 2020). Zhang *et al.* (2023) também reportam o crescimento de *Faecalibaculum* e *Akkermansia* na fermentação fecal *in vitro* estimulado pela presença de fibra solúvel de farelo de trigo digerido. A fermentação fecal *in vitro* de amostras de suco de laranja contendo glico-oligossacarídeos e dextrana produziu AGCC, como os ácidos butírico, propiônico e isobutírico. Além disso, melhorou a composição e a diversidade da microbiota intestinal em termos de *Bifidobacterium* e *Lactobacillus* (LEITE *et al.*, 2023). Ainda não existe estudos sobre o efeito do suco de açaí contendo ingredientes funcionais na composição da microbiota intestinal.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Polpa de açaí

A polpa de açaí não pasteurizada, sem adição de conservantes e sem açúcar (Tipo A com 14% de sólidos) foi adquirida diretamente do produtor (Petrus Fruit, Castanhal, Pará, Brasil), e mantida congelada a -18 °C até o preparo do suco prebiótico e simbiótico.

4.2 Produção da enzima dextrana-sacarase

A enzima dextrana-sacarase foi produzida pela bactéria *Leuconostoc mesenteroides* B512 F em biorreator alimentado por batelada (DA SILVA; RABELO; RODRIGUES, 2014) e armazenada congelada a -20 °C.

4.3 Testes preliminares

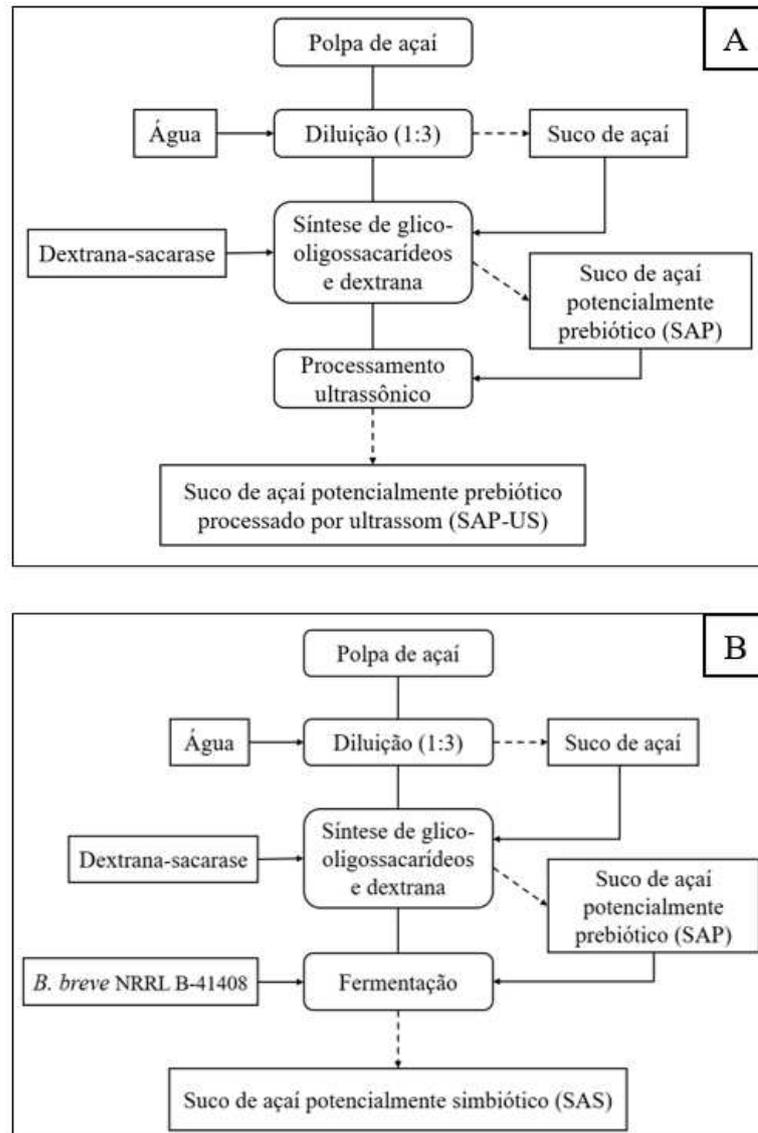
Foram realizados testes preliminares para avaliar a resistência do *Lactocaseibacillus casei* no suco açaí contendo glico-oligossacarídeos e dextrana após a digestão simulada *in vitro* (APÊNDICE A), testes de ativação do *B. breve* NRRL B-41408 a fim de reduzir o tempo de produção do suco fermentado (APÊNDICE B) e testes para identificar o melhor tempo de processamento por ultrassom de alta intensidade com base na composição química do suco e na viabilidade de *B. breve* NRRL B-41408 (APÊNDICE C).

4.4 Desenvolvimento dos sucos funcionais

Os sucos funcionais elaborados nesta pesquisa foram dois, sendo o primeiro o suco de açaí contendo glico-oligossacarídeos e dextrana processado por ultrassom de alta intensidade

(SAP-US). E o segundo, o suco de açaí contendo glico-oligossacarídeos e dextrana fermentado com *Bifidobacterium breve* NRRL B-41408 (SAS) e armazenado por 42 dias a 4 °C. Os preparos dos sucos foram realizados conforme o fluxograma da Figura 4.

Figura 4 - Fluxograma de elaboração dos sucos funcionais SAP-US (A) e SAS (B).

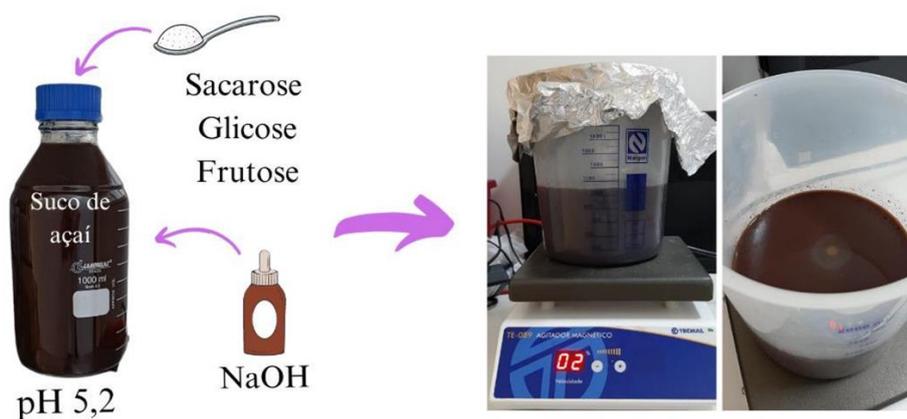


Fonte: elaborada pela autora.

4.5 Preparo do suco de açaí prebiótico

O suco de açaí foi preparado pela diluição de 100 g polpa de açaí para 200 mL de água (1:3), conforme as recomendações do fabricante. A síntese de glico-oligossacarídeos no suco foi desenvolvida de acordo com o protocolo do grupo de pesquisa do LABIOTEC - Laboratório de Biotecnologia da Universidade Federal do Ceará (LEITE *et al.*, 2021; NASCIMENTO; SANTOS; RODRIGUES, 2022), utilizando a enzima dextrana-sacarase pelo mecanismo de reação do aceptor (ARAÚJO *et al.*, 2015; COELHO *et al.*, 2015). Foram adicionados sacarose (75 g/L) e os açúcares redutores frutose (37,5 g/L) e glicose (37,5 g/L) ao suco, na qual foram os substratos para a síntese enzimática de glico-oligossacarídeos e dextrana. O pH foi ajustado para 5,2 utilizando NaOH e a enzima dextrana-sacarase (1UI/mL) foi adicionada ao suco. A síntese foi realizada em béquer de 2 L contendo 1 L de meio reacional, nas condições ótimas da enzima (30 °C e pH 5,2) durante 6 h, sob agitação magnética (Figura 5). Após a síntese, o pH foi ajustado para 4,2 com ácido cítrico para a inativação enzimática e realizaram-se as análises de dextrana (g/L), glico-oligossacarídeos (g/L), glicose (g/L) e frutose (g/L). O suco foi mantido congelado (-18 °C) até o processamento por ultrassom de alta intensidade, bem como preparo do suco simbiótico.

Figura 5 - Síntese de glico-oligossacarídeos em suco de açaí.



Fonte: elaborada pela autora.

4.6 Processamento ultrassônico

O processamento ultrassônico de alta intensidade foi realizado no suco de açaí prebiótico (SAP) utilizando equipamento desruptor de células ultrassônico (ECO-SONICS®, Indaiatuba, SP, Brasil, 500W/19 kHz) com uma macroponteira de titânio de 13 mm. O suco prebiótico (150 mL) foi colocado em reator de vidro encamisado (250 mL) com temperatura controlada por banho-maria (25 °C). O processamento foi realizado com a ponteira submersa em 1,5 cm no suco. Utilizaram-se 99% da potência total (495 W), correspondendo a 373 W/cm². O tempo de processamento foi de 9 min (Figura 6).

Figura 6 - Desruptor de células ultrassônico.



Fonte: elaborado pela autora.

3.5.1 Cálculo da intensidade da energia ultrassônica

O cálculo da intensidade da energia ultrassônica dissipada pela macroponteira de titânio foi realizado conforme a equação 1 (LI; PORDESIMO; WEISS, 2004). Nesta pesquisa aplicou-se o nível de 99% da potência total (500 W), o que equivale a 495 W. Dessa forma, a intensidade ultrassônica correspondeu a 373 W/cm².

$$I = \frac{P}{\pi r^2} \quad (1)$$

onde, P é a potência aplicada (Watt) e r é o raio da macroponteira de titânio (cm).

3.6 Preparo do suco açáí simbiótico (SAS)

Após a síntese de glico-oligossacarídeos no suco de açáí não-sonicado, este foi fermentado com a cultura probiótica para a produção do suco simbiótico. O estoque de *Bifidobacterium breve* NRRL B-41408 (1,5 mL) foi previamente ativado em 100 mL de caldo *bifidobacterium*, específico para esse microrganismo, contendo peptona (10 g/L), caseína (20 g/L), extrato de levedura (10 g/L), glicose (20 g/L), extrato de tomate (8,0 g/L) e Tween 80 (2,0 mL/L), adicionado de 10 mL de tampão fosfato de potássio bibásico (20 g/L) a pH 6,7.

A ativação foi realizada em incubadora SHAKER (Solab ®) por 18 h à 37 °C com agitação de 100 rpm sob anaerobiose, conforme testes preliminares para reduzir o tempo de elaboração do suco fermentado sem perder a viabilidade do probiótico. O sistema de anaerobiose consistiu na inertização do meio com N₂ para remover o O₂, utilizando erlenmeyer com tampa de rosca embalado com filme plástico.

A concentração inicial de células do inóculo foi de 9,0 log UFC/mL, conforme o protocolo já utilizado por outros pesquisadores do grupo de pesquisa do LABIOTEC (SILVA; CAMPELO; RODRIGUES, 2022). Após a ativação, 500 mL de suco de açáí contendo glico-oligossacarídeos e dextrana foi inoculado com 2% (v/v) do meio ativado com *Bifidobacterium breve* NRRL B-41408 e fermentado estaticamente sob anaerobiose por 22 h a 37 °C em incubadora BOD MA 415 (Marconi ®).

3.7 Armazenamento do suco de açáí simbiótico

As amostras de SAS foram armazenadas sob refrigeração a 4 °C por 42 dias, na qual a cada 7 dias o pH, viabilidade microbiológica e a concentração de dextrana, glico-oligossacarídeos, açúcares, ácidos orgânicos e AGCC foram determinados (Figura 7).

Figura 7 - Suco de açaí simbiótico armazenado a 4 °C.



Fonte: elaborada pela autora.

3.8 Viabilidade de *Bifidobacterium breve* NRRL B-41408

As contagens de células viáveis foram realizadas em meio ágar *bifidobacterium*, específico para esse microrganismo, composto por ágar (15 g/L), peptona (10 g/L), caseína (20 g/L), extrato de levedura (10 g/L), glicose (20 g/L), extrato de tomate (8,0 g/L) e Tween 80 (2,0 mL/L). A viabilidade foi expressa em Log UFC/mL. A taxa de sobrevivência foi calculada conforme a Equação 2 durante o armazenamento.

$$\text{Taxa de sobrevivência} = \frac{\text{Log}_{\text{final}}}{\text{Log}_{\text{inicial}}} \times 100 \quad (2)$$

3.9 Digestão simulada *in vitro*

A sobrevivência de *B. breve* no SAS durante a passagem pelo trato gastrointestinal, bem como a integridade dos glico-oligosacarídeos e dextrana dos sucos SAP, SAP-US e SAS foram avaliadas em modelo semi-dinâmico de digestão simulada *in vitro*. O sistema consiste em três biorreatores de vidro (300 mL) sequenciais acoplados ao controlador BIO-TEC-PRO® (LEITE *et al.*, 2021). Foram fixados a temperatura em 37 °C e a agitação em 350 rpm.

As soluções gástricas e entéricas foram adicionadas aos biorreatores referentes a cada fase, preparadas de acordo com Lo curto *et al.* (2011), MARTINEZ *et al.* (2011); MINEKUS *et al.* (2014), com adaptações. A solução gástrica para a fase I foi composta de cloreto de sódio (47,2 mmol/L), cloreto de potássio (6,9 mmol/L), fosfato de potássio monobásico (0,9 mmol/L), cloreto de magnésio hexahidratado (0,1 mmol/L), bicarbonato de sódio (25 mmol/L), cloreto de cálcio (0,3 g/L), pepsina (2,4 g/L) 600 U/mL (Sigma Aldrich®). O pH foi ajustado com NaOH 1M e/ou HCl 1M para $2,3 \pm 0,2$.

As soluções duodenal e jejunal foram preparadas com a mesma composição, cloreto de sódio (38,4 mmol/L), cloreto de potássio (6,8 mmol/L), fosfato de potássio monobásico (0,64 mmol/L), cloreto de magnésio hexa hidratado (0,33 mmol/L), bicarbonato de sódio (85 mmol/L), cloreto de cálcio (0,37 g/L), pancreatina (0,9 g/L) (Sigma Aldrich®) e bile 6 (g/L) (Sigma Aldrich®). O pH foi ajustado com NaOH 1M e/ou HCl 1M para $5,0 \pm 0,3$ e $7,0 \pm 0,3$ para as fases entérica I e II, respectivamente.

O primeiro biorreator foi alimentado com 190 mL de suco de açaí bombeado durante 10 min. Em cada biorreator foram adicionados 100, 60 e 50 mL de solução gástrica, entérica I e entérica II, respectivamente. Cada fase da digestão teve duração de 2 h, sendo 60 min o tempo de residência nos biorreatores e os outros 60 min de transferência, realizada pelo funcionamento das bombas peristálticas. Foram bombeados 280 mL da fase gástrica para a entérica I e 298 mL da entérica I para a entérica II. Foram coletadas amostras de cada fase da digestão para avaliar a viabilidade de *B. breve*, bem como a integridade dos glico-oligosacarídeos e dextrana. O tempo total da digestão simulada foi de 6 h.

3.10 Inóculo fecal

O experimento de fermentação fecal seguiu as recomendações do Conselho Nacional de Saúde (Resolução nº 466, 2012), sendo previamente aprovado em dois projetos no Comitê de Ética em Pesquisa (nº CAAE: 56171022.2.0000.5054/ CAAE: 51874021.0.0000.5054). No experimento realizado com o suco de açaí prebiótico, fezes frescas humanas foram fornecidas por quatro voluntários saudáveis (25 a 40 anos), sendo que a mistura de fezes de dois voluntários fermentou a amostra SAP e a dos outros dois fermentaram SAP-US. Enquanto na amostra de SAS, cada doador forneceu fezes para fermentar um suco separadamente. Os doadores A e B corresponderam a 1ª repetição do experimento e os doadores C e D corresponderam a 2ª repetição do experimento. Os doadores não haviam consumido prebióticos e probióticos concentrados e nem ingerido antibióticos ou outros medicamentos que podem afetar a microbiota intestinal a pelo menos 3 meses da coleta das fezes. Os doadores assinaram um Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) a fim de garantir o caráter voluntário da pesquisa (APÊNDICE D).

As amostras fecais foram coletadas em coletor universal, homogeneizadas em solução salina tamponada com fosfato 0,1 M (5,8 g/L de NaCl + 14,15 g/L de Na₂HPO₄ + 11,95 g/L de NaH₂PO₄), pH 7,0, para obter uma suspensão a 10% (p/v) e borbulhadas com N₂ para remover o O₂ e armazenadas por no máximo quatro horas a 4 °C (AMORIM *et al.*, 2020).

3.11 Fermentação pela microbiota intestinal

A suspensão do inóculo fecal foi inoculada no terceiro reator após a fase entérica II. A concentração de inóculo fecal no reator foi de 1% (p/v). As amostras foram coletadas em 0, 24 e 48 h de fermentação e centrifugadas a 10.000 x g a 4 °C/20 min. O sobrenadante foi usado para as análises de açúcares, dextrana, ácidos orgânicos e AGCC, enquanto os precipitados de 0 h e 48 h foram usados para sequenciamento de gene 16S rRNA. A fermentação fecal dos sucos SAP e SAP-US foi realizada após o descongelamento deles. Em contrapartida, SAS foi fermentado com inóculo fecal logo após a sua elaboração, realizada no dia 0 (primeiro dia de armazenamento) e após 42 dias de armazenamento refrigerado a 4 °C.

3.12 Determinações analíticas

3.12.1 Atividade enzimática da dextrana-sacarase

A atividade da enzima dextrana-sacarase foi avaliada por meio da quantificação de frutose liberada na reação contendo sacarose como substrato (HEINCKE *et al.*, 1999). O resultado foi expresso em unidade internacional de dextrana-sacarase (UI), que é a quantidade de enzima que produz um μmol de frutose a partir da sacarose por minuto (TANRISEVEN; DOGAN, 2002).

Foram preparados 100 mL de uma solução de atividade contendo 18,2 mL de solução estoque de sacarose (600 g/L) em tampão acetato de sódio 20 mM com 0,05 g/L de CaCl_2 e 4,5 mL de tampão de acetato de sódio 20 mM com 1,2 g/L de CaCl_2 , com pH ajustado para 5,2. Tubos de ensaio codificados como tempo 0 min e tempo 10 min receberam 450 μL da solução de atividade e 50 μL da enzima livre. No tubo de tempo 0 min, foram adicionados 500 μL do reagente de DNS, e ambos os tubos foram incubados a 30 °C por 10 min. Após o tempo de reação, 500 μL do reagente de DNS foram adicionados ao tubo de tempo 10. Os tubos foram aquecidos por 5 min a 100 °C e resfriados em banho de gelo até atingirem a temperatura ambiente (25 °C). Em seguida, foram acrescentados aos tubos 9,0 mL de água destilada. A densidade ótica foi verificada em espectrofotômetro UV-visível (Global Trade Technology®) no comprimento de onda de 540 nm. Para o branco, o volume de enzima foi substituído por água. O cálculo da atividade enzimática foi efetuado conforme a Equação 3.

$$\text{Atividade enzimática (UI/mL)} = \left(\frac{ABS_{10} - ABS_0}{\alpha - 180} \right) \times 10^3 \quad (3)$$

onde, α = coeficiente angular da curva de calibração de DNS (mg/ABS.mL); ABS_{10} = valor médio das leituras da absorbância no tempo 10; ABS_0 = valor médio das leituras da absorbância no tempo 0.

3.12.2 *Análise de dextrana produzida durante a síntese enzimática no suco*

A dextrana foi precipitada adicionando 3 volumes de álcool 96% (v/v) à amostra. O sobrenadante foi utilizado para quantificar os glico-oligossacarídeos, açúcares, ácidos orgânicos e AGCC. A dextrana precipitada foi ressuspensa e diluída em água destilada e quantificada pelo método fenol-ácido sulfúrico (DUBOIS *et al.*, 1956).

3.12.3 *Análise do grau de polimerização dos glico-oligossacarídeos*

As amostras dos sucos SAP, SAP-US e SAS digeridos e fermentados pela microbiota intestinal humana foram diluídas em água ultrapura (Milli-Q System, Millipore®), filtradas usando membrana de acetato de celulose com 0,45 µm (Millipore®) e analisadas por cromatografia de camada delgada (*Thin Layer Chromatography* - TLC) usando placas de sílica gel (Merck®, 20 × 20 cm, Art. 1.05553.0001). Amostras de 5 µL foram aplicadas pelo TLC autosampler (ATS 4, CAMAG®, Muttenz, Switzerland) pré-condicionado a 60 °C, à 1,0 cm da borda da placa e a uma distância de separação de 1,0 cm entre cada amostra. As placas foram dispostas na cuba de TLC e uma mistura de acetonitrila, acetato de etila, 1-propanol e água (8,5: 2,0: 5,0: 9,0, v/v/v/v) foi usada para fazer a separação dos carboidratos em duas ascensões.

Uma solução composta por 0.3% (p/v) de 1- naftiletlenodiamina e 5% (v/v) de H₂SO₄ concentrado em metanol foi usada para revelar os carboidratos. Os gluco-oligossacarídeos foram quantificados por TLC scanner 4 densitometer (CAMAG). As leituras foram realizadas no comprimento de onda de 490 nm. O software Planar WinCATS Chromatography Manager foi usado para manipular os dados. Os resultados foram expressos em concentração relativa (%) conforme Equação 4 para a digestão simulada e Equação 5 para a fermentação da microbiota intestinal.

$$\text{Concentração relativa (\%)} = \frac{A_{GPi}}{A_T} \times 100 \quad (4)$$

onde, A_{GPi} significa a área cromatográfica específica de um GP ($i = 3$ a 9); A_T significa a soma das áreas cromatográficas de todos os GP. $\sum_3^9 A_{GPi}$.

$$\text{Concentração relativa (\%)} = \frac{A_{GPi}}{A_{GPi(\text{digerido})}} \times \text{concentração relativa}_{GPi(\text{digerido})} \quad (5)$$

onde, A_{DPi} significa a área cromatográfica específica de um GP ($i = 3$ a 9); $A_{GPi(\text{digesrido})}$ significa a áreas cromatográficas específicas de um GP ($i = 3$ a 9) do suco na fase entérica; concentração relativa $_{GPi(\text{digerido})}$ significa a concentração relativa (%) de um GP ($i = 3$ a 9) do suco na fase entérica.

3.12.4 Quantificação de açúcares redutores, ácidos orgânicos e ácidos graxos de cadeia curta

Os açúcares redutores, ácidos orgânicos e ácidos graxos de cadeia curta foram avaliados por *High-Performance Liquid Chromatography* (HPLC) em cromatógrafo Infinity 1260 Agilent®. Um detector de índice de refração a 35 °C foi utilizado para detectar os açúcares, e um detector de UV-DAD a 210 nm foi utilizado para detectar ácidos orgânicos (ácidos ascórbico, acético e láctico) e ácidos graxos de cadeia curta (ácidos propiônico, butírico e isobutírico). Os compostos foram quantificados usando uma curva de calibração. A separação foi feita utilizando coluna BIORAD HPX-87H (300 × 7,8 mm) (Biorad, Hercules, California, USA) a 65 °C. O H₂SO₄ 5 mM foi a fase móvel a 0,6 mL/min.

3.12.5 Quantificação de compostos fenólicos totais

Os compostos fenólicos totais foram determinados de acordo com o método de Folin-Ciocalteu (FOLIN; CIOCALTEU, 1927), com adaptações (LINHARES et al., 2020; SILVA; CAMPELO; RODRIGUES, 2022) nas amostras de SAP e SAP-US. Em microplacas de 96 poços foram adicionados 50 µL do sobrenadante (água foi usada como branco) e misturados com 200 µL do reagente Folin-Ciocalteu diluído em água (1:10). Após 3 min de reação e desenvolvimento da cor azul, foram adicionados 100 µL de solução de carbonato de sódio 4% para interromper a reação. A leitura foi realizada a 765 nm usando um leitor de microplacas Elisa (Biotek Epoch, Winooski, VT, EUA) e o software Gen 5 1.10 foi usado para

lidar com os dados. Os compostos fenólicos totais foram calculados como equivalente em ácido gálico (mg EAG/100 mL) e expressos em concentração relativa (%).

3.12.6 Extração do DNA e sequenciamento do gene 16 rRNA

O DNeasy® PowerLyzer® PowerSoil® Kit (QIAGEN, Venlo, Netherlands) foi utilizado para a extração do DNA conforme as instruções do fabricante. A concentração e integridade do DNA foi avaliada por NanoDrop® (ThermoFisher, Madison, WI, USA). As amostras de DNA extraído foram armazenadas a -20°C. A diversidade microbiana das amostras da fermentação pela microbiota fecal foi avaliada pelo sequenciamento de amplicon do gene ribossomal 16S (16S rRNA). A região variável V4 do gene 16S rRNA foi amplificada utilizando primers específicos (515F-Y and 806R), conforme o protocolo descrito por (PEREIRA *et al.*, 2022). O MiSeq Illumina (Illumina Inc., San Diego, CA, USA) foi usado para sequenciar as amostras.

O banco DADA2 foi utilizado para gerar afiliações taxonômicas. A α -diversidade foi analisada utilizando o software EstimateS (versão 9.1.0, 2023, Colorado, Boulder, USA) para obtenção da riqueza de espécies pelo índice Chao1 (CHAO; BUNGE, 2002) e a diversidade pelo índice de Shannon (SHANNON, 1948).

3.13 Análise estatística

Os resultados foram analisados e expressos como média e desvio padrão. Foram aplicadas análise de ANOVA e t-Student para comparação de médias ao nível de 5% de significância usando o software Statistica (versão 7.0, StatSoft, Hamburg, Germany).

A análise de componentes principais (ACP) foi realizada para mostrar a matriz de correlação entre consumo de substratos, metabólitos e espécies microbianas intestinais utilizando o software Origin (versão OriginPro 2024) (OriginLab Corporation ®, MA, EUA). Um $p < 0,05$ foi considerado estatisticamente significativo.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

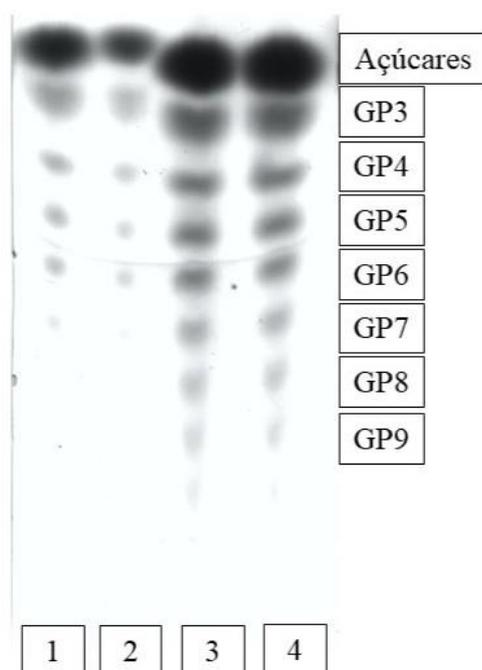
Os resultados e discussão são apresentados em dois tópicos, o primeiro discorre sobre a elaboração do suco de açaí contendo glico-oligossacarídeos e dextrana e o processamento ultrassônico de alta intensidade. Enquanto o segundo, discute os resultados do suco de açaí potencialmente simbiótico.

5.1 Suco de açaí contendo glico-oligossacarídeos e dextrana (SAP)

5.1.1 Síntese de glico-oligossacarídeos em suco de açaí

Neste estudo, verificou-se que é possível realizar a síntese de glico-oligossacarídeos diretamente no suco de açaí a partir da enzima dextrana-sacarase de *Leuconostoc mesenteroides* B512 F, uma vez que houve formação de glico-oligossacarídeos com grau de polimerização até 9 (FIGURA 8). Algumas pesquisas também mostram a síntese enzimática em sucos de fruta, como acerola e caju, utilizando a mesma enzima (LEITE *et al.*, 2021; NASCIMENTO; SANTOS; RODRIGUES, 2022). Este resultado amplia as opções de sucos de fruta potencialmente prebióticos no mercado, e ainda traz como benefícios a possibilidade de realizar a síntese dos prebióticos diretamente no suco com a supressão das etapas de purificação e utilizando-se dos açúcares naturais da matriz (FONTELES; RODRIGUES, 2018).

Figura 8 - Detecção de glico-oligossacarídeos em suco de açaí por Cromatografia em Camada Delgada.



Fonte: Elaborada pela autora.

A síntese de glico-oligossacarídeos em um pequeno volume de suco de açaí realizado em testes preliminares mostrou a formação dos glico-oligossacarídeos no suco por meio da síntese da enzima dextrana-sacarase, confirmada pela análise de Cromatografia em Camada Delgada. Verificou-se GP de até 5 para o sobrenadante do suco e de até 9 para o suco não centrifugado. Dessa forma, o suco de açaí caracteriza-se como um meio adequado para a síntese de glico-oligossacarídeos.

A formação de glico-oligossacarídeos no suco de açaí é um resultado positivo, uma vez que será possível avaliar o efeito prebiótico desses compostos frente ao crescimento dos microrganismos probióticos. Leite *et al.* (2021) verificaram que os glico-oligossacarídeos e a dextrana sintetizados no suco de caju apresentaram efeito prebiótico junto com a tagatose, tendo em vista que diferentes cepas de bactérias probióticas consumiram esses carboidratos do suco após a digestão simulada *in vitro*. Dessa forma, a utilização de suco de fruta como matriz para veiculação de prebióticos se torna bastante promissora dentro do mercado de alimentos funcionais.

Na Tabela 1 consta a composição de carboidratos no suco de açaí após a síntese enzimática (SAP) e após o processamento ultrassônico (SAP-US). Estes sucos foram utilizados na digestão simulada *in vitro* e na fermentação pela microbiota intestinal humana. Verificou-se que o SAP-US apresentou maior concentração de glicose e frutose comparado ao SAP. Em contrapartida houve redução dos glico-oligossacarídeos. Não houve alteração na concentração de dextrana após o processamento.

A aplicação do ultrassom de alta intensidade em suco de açaí promove a extração de açúcares por meio do rompimento da membrana celular, uma vez que o açaí possui alto teor de polpa, na qual estes açúcares podem atuar como substrato na produção de sucos probióticos (LINHARES *et al.*, 2020). É possível que os glico-oligossacarídeos tenham sofrido uma degradação parcial em sua cadeia, levando ao aumento de glicose e frutose. Dificilmente o ultrassom pode degradar frações de baixo peso molecular (CHEN *et al.*, 2024).

Tabela 1 - Composição de carboidratos nos sucos SAP e SAP-US.

Suco de açaí	Glicose (g/L)	Frutose (g/L)	Dextrana (g/L)	Glico- oligossacarídeos (g/L)
SAP	16,55 ± 0,82	27,59 ± 1,37	23,30 ± 0,87	82,56 ± 3,40
SAP-US	18,46 ± 0,92	30,60 ± 1,53	23,12 ± 1,51	77,82 ± 3,50

Fonte: Elaborada pela autora.

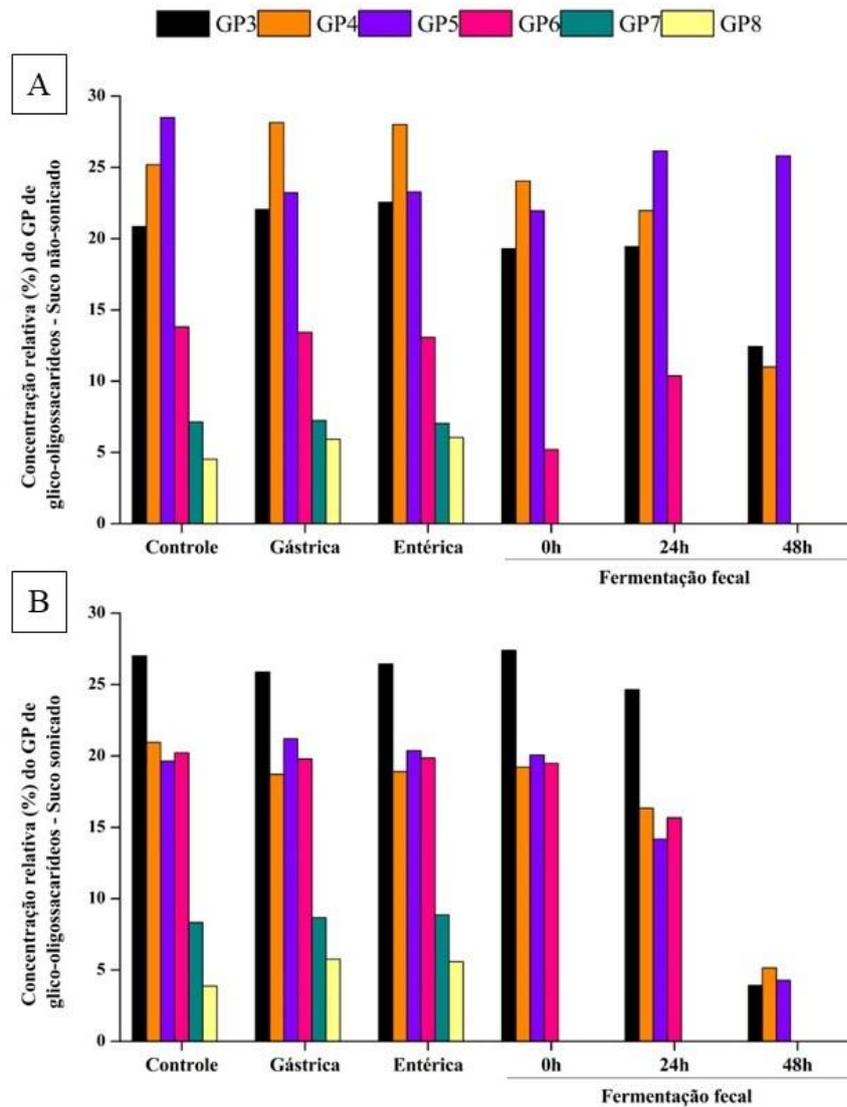
Os glico-oligossacarídeos sintetizados no suco de açaí apresentaram concentração de 8,25 g/100 mL com grau de polimerização (GP) de 3 a 10. A recomendação de uma ingestão média diária de fibra de acordo com a OMS/FAO e EFSA é de 25 g por dia para adultos (NDA, 2010; NISHIDA *et al.*, 2004). Dessa forma, este resultado sugere que o consumo de 350 mL do suco de açaí potencialmente prebiótico seria suficiente para atingir a quantidade mínima diária de fibras recomendada pela OMS/FAO e EFSA.

5.1.2 Consumo de carboidratos durante a digestão simulada *in vitro* e fermentação fecal dos sucos SAP e SAP-US.

A concentração relativa de glico-oligossacarídeos e dextrana foi avaliada durante a digestão simulada *in vitro* e a fermentação fecal. Esses compostos foram resistentes às condições do trato gastrointestinal na digestão simulada *in vitro*. A concentração total de glico-oligossacarídeos no SAP foi de $82,56 \pm 3,40$ g/L (antes da digestão simulada) e $86,77 \pm 4,10$ g/L (após a digestão simulada). O SAP-US apresentou uma concentração de $77,82 \pm 3,50$ g/L de glico-oligossacarídeos (antes da digestão simulada) e $79,18 \pm 4,20$ g/L (após a digestão simulada). A resistência desses carboidratos complexos à digestão é essencial para impulsionar o processo fermentativo pela microbiota intestinal (LEITE *et al.*, 2023). O ligeiro aumento na concentração de glico-oligossacarídeos após a fase entérica pode ser atribuído a hidrólise parcial da dextrana. No final da digestão *in vitro*, suco de acerola processado por ultrassom de alta intensidade por 10 min (suco prebiótico) apresentou aumento de glico-oligossacarídeos e diminuição de dextrana (NASCIMENTO; SANTOS; RODRIGUES, 2022).

A concentração relativa (%) de cada grau de polimerização (GP) dos glico-oligossacarídeos nas amostras SAP e SAP-US na digestão simulada *in vitro* seguida da fermentação fecal é mostrada na Figura 9. O “controle” significa a amostra de suco não-digerida, e as amostras denominadas “gástrica” e “entérica” se referem as amostras de suco de açaí após 2 h e 4 h de digestão simulada, respectivamente. Essas amostras são seguidas pelas amostras de fermentação fecal coletadas em 0, 24 e 48 h.

Figura 9 - Concentração relativa (%) do grau de polimerização (GP) dos glico-oligosacarídeos (GP) durante a digestão simulada *in vitro* e fermentação fecal de SAP (A) e SAS-US (B).



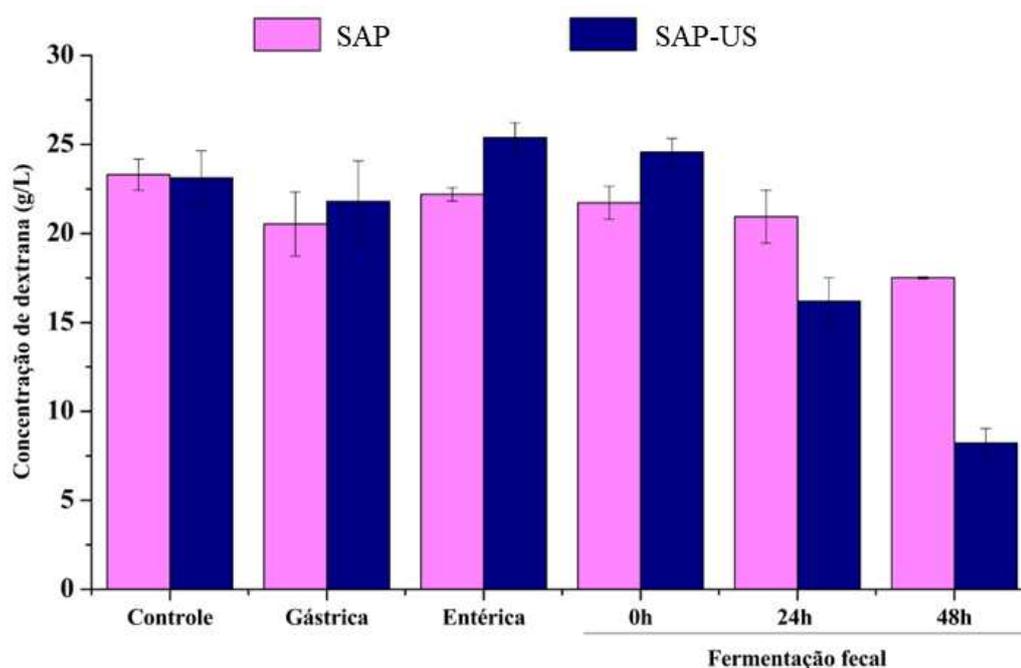
Fonte: Elaborada pela autora.

Os glico-oligosacarídeos sintetizados apresentaram GP de 3 a 8 no suco de açaí. O consumo de glico-oligosacarídeos após 48 h pela microbiota fecal, especialmente os glico-oligosacarídeos de cadeia curta (GP3, GP4 e GP5), foi mais acentuado em SAP-US. As diferenças nos carboidratos consumidos podem estar relacionadas ao processamento ultrassônico e a composição da microbiota intestinal (LEITE *et al.*, 2023).

O processamento ultrassônico pode fragilizar as ligações dos glico-oligosacarídeos e dextrana, favorecendo sua metabolização pelos microrganismos intestinais. Isto pode ser explicado pelo efeito de despolimerização promovido pelo colapso da bolha na cavitação e a interação entre o polímero e as moléculas de alta energia, como os radicais hidroxila produzidos durante a cavitação (GOMES *et al.*, 2017). Em relação à composição intestinal, algumas bactérias são mais propensas a quebrar a ligação glicosídica α -1,6, como as bifidobactérias e *Bacteroides* spp. (GOMES *et al.*, 2017; NAKAMURA *et al.*, 2023).

A concentração de dextrana durante a digestão simulada *in vitro* e fermentação fecal de SAP e SAP-US é apresentado na Figura 10.

Figura 10 - Concentração de dextrana (g/L) durante a digestão simulada *in vitro* e fermentação fecal de SAP e SAP-US.



Fonte: Elaborada pela autora.

A dextrana foi resistente à digestão gástrica e entérica, alcançando valores de $22,20 \pm 0,38$ g/L e $25,38 \pm 0,84$ g/L no suco de açaí prebiótico SAP e SAP-US, respectivamente. A microbiota intestinal consumiu a 19,38% da dextrana da amostra de SAP e 66,54% na amostra de SAP-US. O maior consumo de dextrana na amostra de suco processada pelo ultrassom de alta intensidade pode estar relacionada a uma fragilidade nas ligações da molécula de dextrana

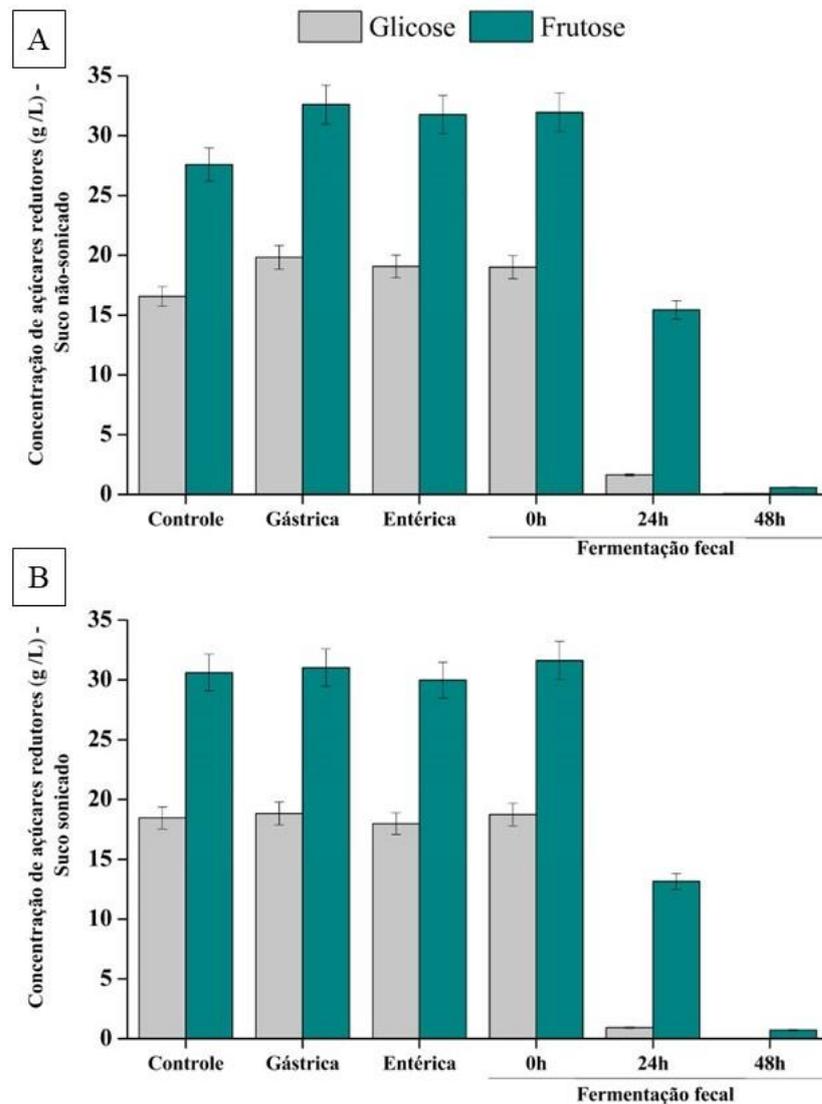
ocasionada pelo colapso das bolhas e a alta liberação de energia durante o processamento, facilitando sua assimilação pela microbiota intestinal (GOMES *et al.*, 2017).

Suco de caju prebiótico contendo glico-oligossacarídeos e dextrana apresentou comportamento semelhante, na qual o probiótico *L. casei* NRRL B-442 consumiu preferencialmente a dextrana em relação aos glico-oligossacarídeos (LEITE *et al.*, 2021). Glico-oligossacarídeos e dextrana em suco de acerola processado por ultrassom de alta intensidade (373 W/cm², 10 min a 40 °C) também apresentaram estabilidade significativa no final da digestão *in vitro* (NASCIMENTO; SANTOS; RODRIGUES, 2022). O efeito prebiótico da dextrana pode estar associado com suas ligações glicosídicas α -1,6, que são menos susceptíveis a ação de enzimas digestivas humanas, como a pancreatina e a pepsina (KOTHARI; TINGIRIKARI; GOYAL, 2015). A glicose e a frutose do suco de açaí prebiótico permaneceram estáveis durante a digestão simulada *in vitro* e foram consumidos na fermentação fecal (Figura 11).

A microbiota fecal consumiu 91,38% de glicose e 51,70% de frutose em 24 h na amostra de SAP. Por outro lado, a microbiota fecal consumiu 95,09% de glicose e 58,40% de frutose após 24 h na amostra de SAP-US na fermentação fecal. Ao final da fermentação fecal (48 h), a glicose foi completamente consumida, enquanto a frutose apresentou níveis residuais baixos (< 3%) em ambas as amostras.

A fermentação fecal *in vitro* visa mimetizar o sistema digestivo humano, com a vantagem de rastrear o consumo de carboidratos complexos, o que não é viável em modelo *in vivo*. O consumo de açúcares redutores (como glicose e frutose) pela microbiota intestinal depende da matriz alimentar e da composição da microbiota intestinal. Ao contrário da glicose, que é quase totalmente absorvida no intestino delgado, cerca de 30% a 90% da frutose e dos álcoois de açúcar passam para o intestino grosso (DI RIENZI; BRITTON, 2020). A resistência dos carboidratos complexos, como os carboidratos prebióticos, ao trato gastrointestinal permite que cheguem a intestino grosso, onde são decompostos em glicose ou frutose e consumidos pela microbiota. No presente estudo, fica claro que a glicose foi consumida preferencialmente na fermentação fecal, seguida pela frutose.

Figura 11 - Concentração de açúcares redutores (g/L) durante a digestão simulada *in vitro* e fermentação fecal do suco de açaí prebiótico SAP (A) e SAP-US (B).



Fonte: Elaborada pela autora.

O consumo de glico-oligossacarídeos e dextrana foi principalmente entre 24 e 48 horas de fermentação fecal, quando o nível de glicose estava baixo. Alguns microrganismos consomem preferencialmente estes carboidratos complexos, apesar da presença de açúcares simples. Na fermentação *in vitro* de suco de caju, glico-oligossacarídeos e dextrana foram preferencialmente consumidos por *L. casei* e *Bifidobacteria*, mesmo com altos níveis de glicose e frutose (LEITE *et al.*, 2021). O mesmo comportamento foi observado para suco de laranja (LEITE *et al.*, 2023). Portanto, os carboidratos prebióticos como glico-oligossacarídeos e

dextrana promovem o crescimento de espécies de bactérias benéficas, potencialmente melhorando a diversidade e a composição da microbiota intestinal, além disso produzem AGCC (LEITE *et al.*, 2023; PERRI *et al.*, 2022).

5.1.3 Bioacessibilidade de compostos fenólicos totais e ácido ascórbico do suco de açaí prebiótico

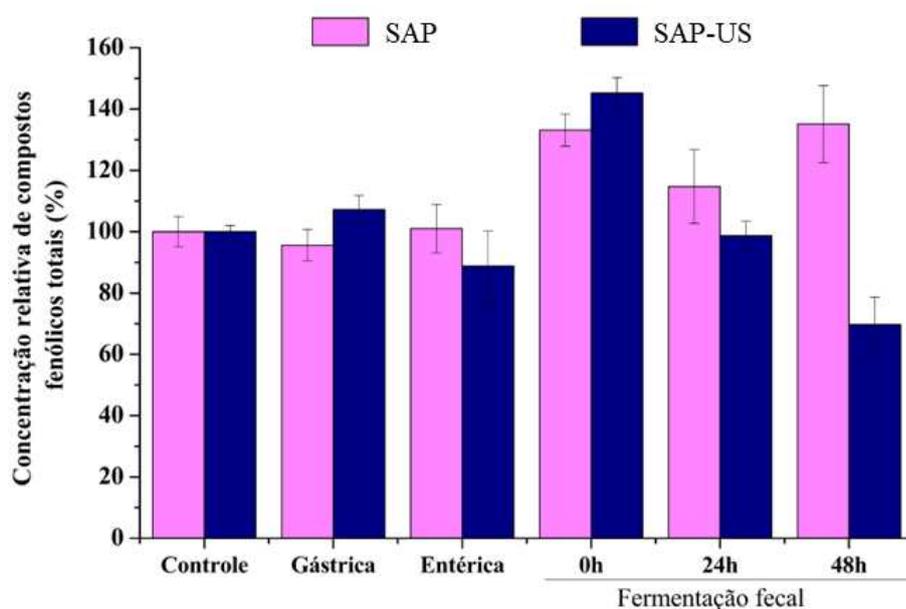
O açaí é uma fruta importante para a biodiversidade amazônica devido à presença de compostos bioativos em sua composição, incluindo antocianinas, compostos fenólicos totais e flavonoides totais (LISBOA *et al.*, 2022). Neste estudo, os efeitos do processamento ultrassônico do suco de açaí prebiótico foram avaliados na bioacessibilidade dos compostos bioativos. Os sucos SAP e SAP-US apresentaram $148,33 \pm 3,33$ e $145,55 \pm 8,46$ mg EAG/100mL de compostos fenólicos totais, respectivamente ($p > 0,05$). Os efeitos do processamento ultrassônico na composição dos alimentos são influenciados pelas condições dos parâmetros ultrassônicos (potência, intensidade, densidade energética e duração) e propriedades dos alimentos (sólido, líquido, semissólido e viscosidade). Esses efeitos estão principalmente relacionados ao fenômeno da cavitação (MOOSAVI *et al.*, 2021). O fenômeno da cavitação que ocorre por ondas de alta intensidade que geram bolhas que acumulam energia chegando a um ponto crítico onde implodem e liberam energia. Esta quebra das interações intermoleculares dos compostos da matriz dos alimentos, causa a extração de compostos pelo dano às células (CHAVES *et al.*, 2020). Porém, após a liberação de fenólicos das estruturas celulares dissociadas, pode ocorrer degradação oxidativa devido aos radicais livres produzidos como resultado do processamento ultrassônico compensado pela liberação desses compostos (ASLAM *et al.*, 2023). Os glico-oligossacarídeos e a dextrana podem ter protegido da lesão ultrassônica a parede celular dos compostos fenólicos, não havendo extração desses compostos após o processamento. Alguns autores relatam a importância da interação entre os componentes da matriz alimentar quando se aplica um processamento por tecnologias não-térmicas (ALMEIDA *et al.*, 2017; FONTELES; RODRIGUES, 2018).

Fonteles *et al.* (2021) relataram aumento na capacidade antioxidante correlacionada com o aumento de compostos fenólicos totais e flavonoides amarelos em suco de caju não prebiótico após processamento ultrassônico (373 W/cm^2 , 10 min a $40 \text{ }^\circ\text{C}$). O

processamento de suco de açaí por ultrassom de alta intensidade melhorou a bioacessibilidade de antocianinas, que reduziram durante a fase gástrica, mas mantiveram sua concentração na fase entérica (CARVALHO *et al.*, 2020).

A bioacessibilidade é definida como a quantidade de nutrientes ou não nutrientes liberada da matriz alimentar durante a digestão *in vitro* ou fermentação pela microbiota intestinal e disponível para ser absorvida e utilizada pelo organismo humano (CIANCIOSI *et al.*, 2022; ZHANG *et al.*, 2023a). Nas amostras SAP e SAP-US, a bioacessibilidade dos compostos fenólicos totais foi avaliada durante a digestão e fermentação *in vitro* (Figura 12). Os resultados mostraram um aumento na concentração relativa dos compostos fenólicos totais em 0 h de fermentação fecal em ambos os sucos de açaí, ou seja, na última fase da digestão, momento que o inóculo fecal foi adicionado. Esse resultado corrobora com um estudo realizado com suco de acerola prebiótico processado durante 6 min, na qual foi verificado aumento na bioacessibilidade de compostos fenólicos totais, alcançando concentração relativa 156% na última fase da digestão (NASCIMENTO; SANTOS; RODRIGUES, 2022).

Figura 12 - Concentração relativa de compostos fenólicos totais (%) durante a digestão simulada *in vitro* e fermentação fecal de suco de açaí prebiótico SAP e SAP-US.



Fonte: Elaborada pela autora.

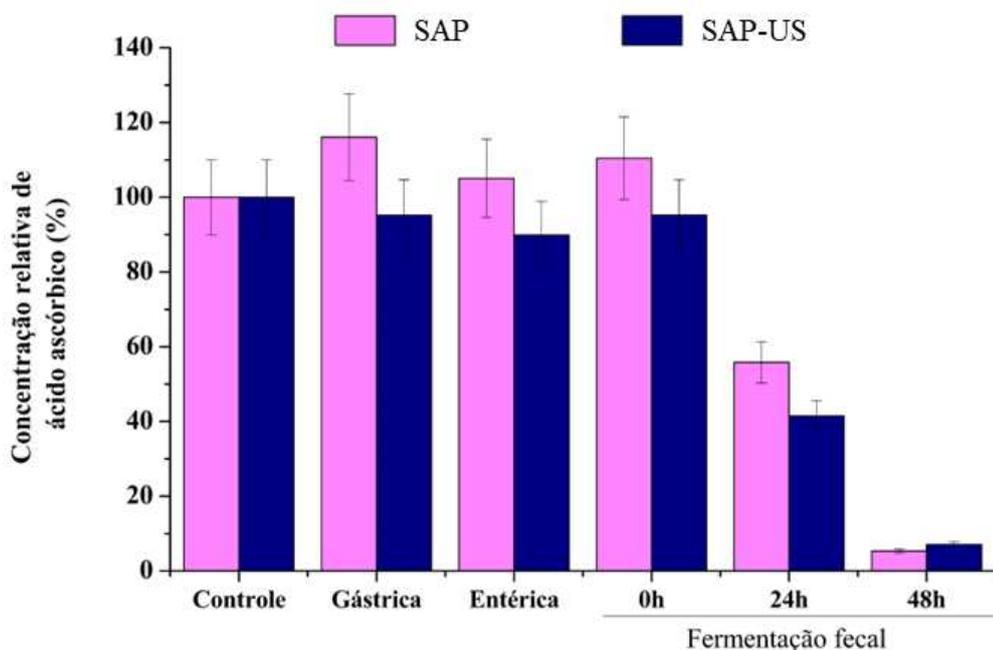
Após 48 h de fermentação fecal, os compostos fenólicos totais foram degradados ou metabolizados pela microbiota intestinal, principalmente na amostra de SAP-US. Em

contrapartida, houve um aumento na concentração relativa na amostra de suco SAP. Este fato pode estar relacionado com a presença dos glico-oligossacarídeos e dextrana, apoiando a hipótese de que os compostos fenólicos estariam ligados aos carboidratos complexos do suco de açaí prebiótico. Portanto, um maior consumo de prebióticos pela microbiota fecal na fermentação com SAP-US pode ter resultado em maior liberação de compostos fenólicos totais. Dessa forma, a sua assimilação pela microbiota também foi maior.

A metodologia utilizada para determinar os compostos fenólicos totais (Folin-Ciocalteu) baseia-se no mecanismo de interação de oxidação/redução e apresenta como limitação a possibilidade de redução de compostos não fenólicos, como aminoácidos, proteínas, algumas vitaminas e íons inorgânicos (MARGRAF *et al.*, 2015). Dessa forma, a adição do inóculo fecal pode ter interferido no resultado de compostos fenólicos totais pela presença de proteínas, por exemplo, resultando em superestimação do resultado. As proteínas podem estar presentes nas fezes quando certas ligações peptídicas não são hidrolisadas no processo digestivo, então parte da proteína é excretada nas fezes (PIRES *et al.*, 2006).

O ácido ascórbico (vitamina C) mostrou resistência durante a digestão simulada *in vitro* dos sucos SAP e SAP-US (Figura 13).

Figura 13 - Concentração relativa de ácido ascórbico (%) durante a digestão simulada *in vitro* e fermentação fecal de sucos SAP e SAP-US.



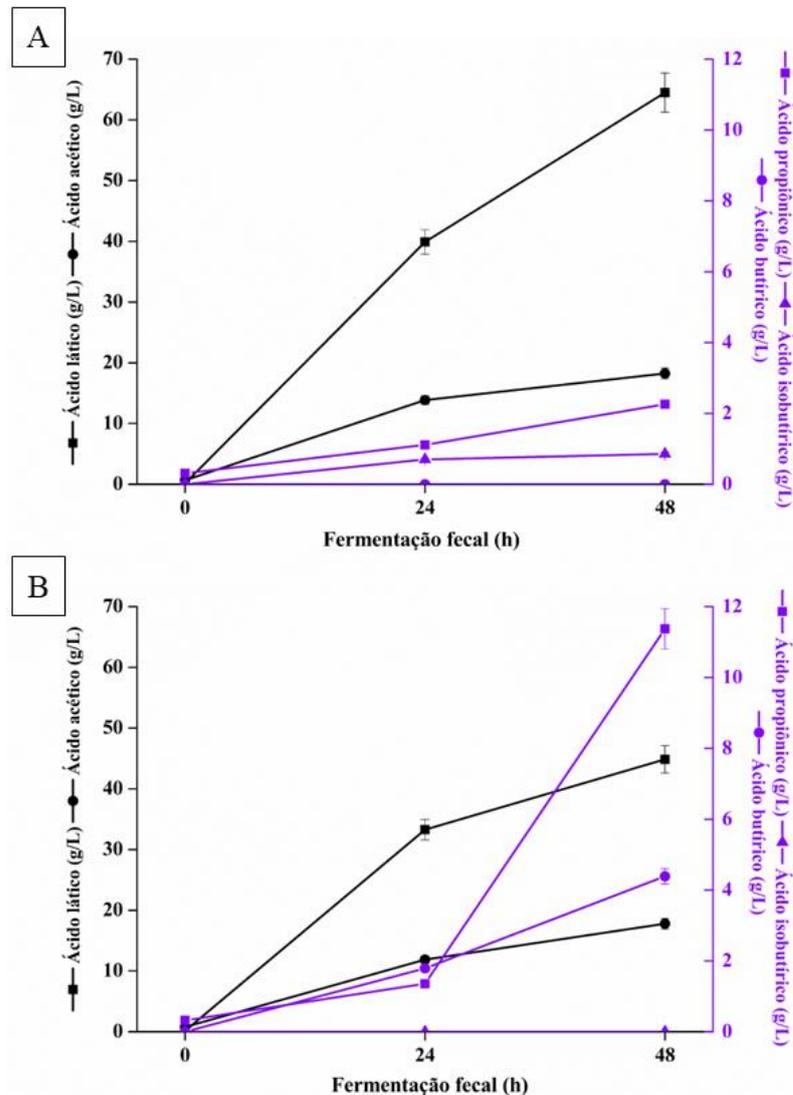
Fonte: Elaborada pela autora.

Temperatura acima de 30 °C e o pH gástrico e intestinal podem degradar o ácido ascórbico reduzindo sua bioacessibilidade durante a digestão (BUNIOWSKA *et al.*, 2017). No entanto, a composição da matriz pode ter algum efeito sobre o ácido ascórbico do suco de açaí prebiótico. Ao longo da digestão, o ácido ascórbico ficou estável nas amostras, mas diminuiu 95,21% e 92,6% durante a fermentação fecal nas amostras de SAP e SAP-US, respectivamente, após 48 h. A concentração de ácido ascórbico também diminuiu durante a fermentação fecal do suco de laranja prebiótico (LEITE *et al.*, 2023). A ingestão de ácido ascórbico está associada à regulação da composição da microbiota intestinal (LI *et al.*, 2023), na qual, quando ingerido em doses elevadas, o ácido ascórbico pode ser degradado por microrganismos do intestino grosso (PHAM *et al.*, 2021).

5.1.4 Produção de ácidos orgânicos e AGCC na fermentação fecal dos sucos SAP e SAP-US

Os AGCC são um dos metabólitos de bactérias intestinais humanas mais bem caracterizados, amplamente utilizados para apoiar a relação entre a microbiota intestinal e a saúde do hospedeiro (PALMNÄS-BEDARD *et al.*, 2022). Assim, a fermentação fecal *in vitro* das amostras de suco de açaí prebiótico SAP e SAP-US produziu ácido láctico e AGCC, tais como acético, propiônico e butírico (Figura 14).

Figura 14 - Ácidos orgânicos e ácidos graxos de cadeia curta (g/L) durante a fermentação fecal de suco de açaí prebiótico SAP (A) e SAP-US (B).



Fonte: Elaborada pela autora.

O ácido lático foi o principal metabólito produzido, porém em menor quantidade na fermentação fecal do SAP-US ($44,85 \pm 2,24$ g/L). Em contraste, a produção de ácido acético foi similar em ambos os sucos. A produção de ácido lático e ácido acético pode ocorrer pela fermentação de carboidratos complexos ou indigeríveis por membros de *Bifidobacteria*, ou alimentação cruzada com outras bactérias colonicas produtoras de butirato (DE VUYST *et al.*, 2014; MOENS; VERCE; DE VUYST, 2017). Portanto, utilizar prebióticos na dieta pode aumentar a seletividade de bactérias benéficas, melhorando a saúde do consumidor.

A produção dos ácidos propiônico e butírico aumentou após 48 h de fermentação na amostra de SAP-US, alcançando concentrações de $11,37 \pm 0,56$ e $4,38 \pm 0,21$ g/L, respectivamente. O ácido butírico diminui a inflamação e melhora a função da barreira intestinal, reduzindo a permeabilidade do epitélio intestinal e a translocação bacteriana (FACHI *et al.*, 2019). Altas concentrações séricas humanas de ácido butírico e propiônico e o desenvolvimento de bactérias benéficas na microbiota intestinal podem estar associados à redução do estresse oxidativo, da resistência à insulina e da inflamação (RYUK *et al.*, 2022).

Os resultados da produção de AGCC correlacionaram-se ao maior consumo de glico-oligossacarídeos e dextrana após 48 h de fermentação fecal na amostra de SAP-US. As diferenças nas proporções de metabólitos produzidos podem estar associadas ao perfil individual de cada microbiota intestinal. Como a microbiota fecal muda diariamente, essas diferenças são esperadas mesmo em estudos *in vivo*.

O ácido propiônico foi produzido em maior quantidade na amostra de SAP-US. As bactérias que produzem este ácido a partir de glico-oligossacarídeos prebióticos podem compreender os gêneros *Bacteroides*, *Bifidobacterium* e *Lactobacillus* (LEITE *et al.*, 2023; SHI *et al.*, 2018).

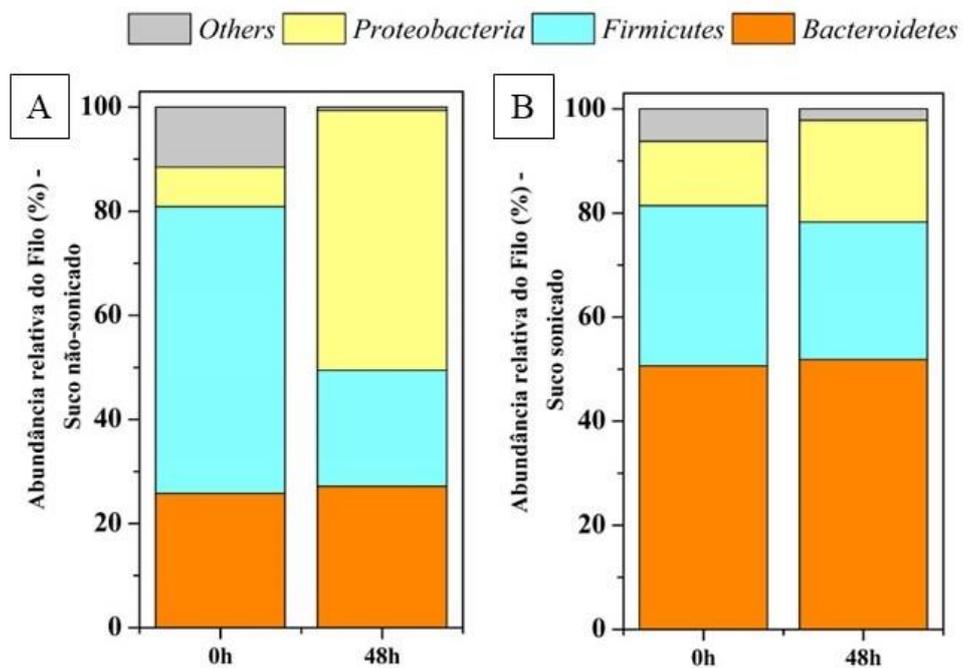
5.1.5 Análises da microbiota fecal da fermentação do suco de açaí prebiótico

5.1.5.1 Abundância relativa

A abundância relativa ao nível de Filo após a fermentação fecal é apresentada na Figura 15. A microbiota fecal fermentada com suco de açaí SAP apresentou redução de *Firmicutes* de 55,12 para 22,29% e aumento de *Proteobacteria* de 7,58 para 49,92%. *Bacteroidetes* aumentou de 25,77 para 27,16%. A microbiota fermentada com SAP-US compreendeu 51,87% de *Bacteroidetes* e 26,43% de *Firmicutes*. A fermentação fecal do SAP-US promoveu diminuição de *Firmicutes* (30,81 para 26,43%) e *Proteobacteria* aumentou de 12,33% para 19,50%.

Após 48 h, as amostras fecais fermentadas com suco de laranja prebiótico digerido exibiram uma redução na abundância relativa de *Firmicutes* (LEITE *et al.*, 2023). A menor redução de *Firmicutes* observada na microbiota fecal após a fermentação da amostra de SAP-US pode estar ligada à produção de ácido butírico, uma vez que certos grupos de *Firmicutes* convertem ácidos acético e láctico em butirato (ANDRADE *et al.*, 2020).

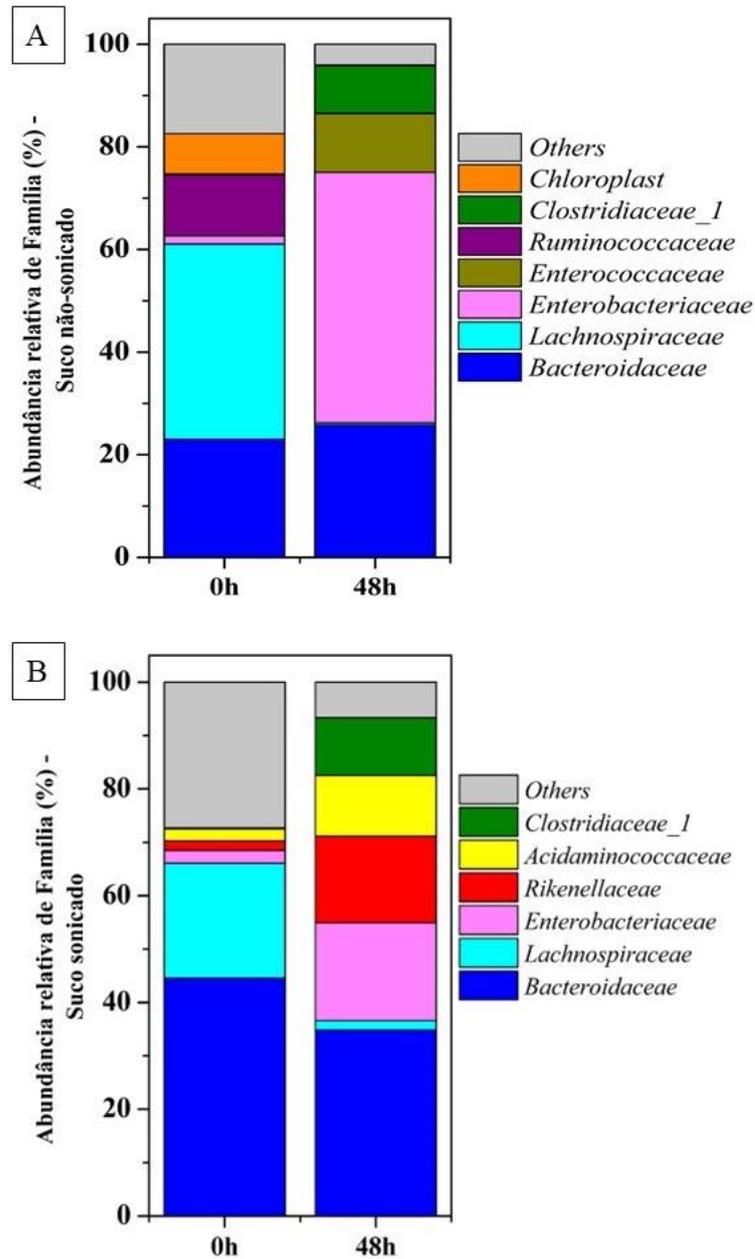
Figura 15 - Abundância relativa (%) da microbiota fecal no nível taxonômico de Filo antes e depois da fermentação do suco de açaí prebiótico SAP (A) e SAP-US (B).



Fonte: Elaborada pela autora.

A abundância relativa das famílias também teve alteração após a fermentação fecal nas amostras de suco de açaí (Figura 16).

Figura 16 - Abundância relativa (%) da microbiota fecal no nível taxonômico de Família antes e depois da fermentação do suco de açaí prebiótico SAP (A) e SAP-US (B).



Fonte: Elaborada pela autora.

A família *Lachnospiraceae* diminuiu, enquanto *Enterobacteriaceae* aumentou após a fermentação fecal na amostra de SAP. A concentração de *Bacteroidaceae* (25,81%), *Enterobacteriaceae* (48,81%), *Enterococcaceae* (11,41%), e *Clostridiaceae_1* (9,19%) aumentou após 48 h de fermentação fecal em SAP. No SAP-US, *Bacteroidaceae* (34,82%) e

Clostridiaceae_1 (10,79%) reduziram, enquanto *Enterobacteriaceae* (18,30%), *Rikenellaceae* (16,24%), *Acidaminococcaceae* (11,40%) predominaram.

O aumento da abundância relativa da família *Rikenellaceae* após a fermentação fecal no SAP-US pode ser devida à produção de ácidos graxos de cadeia curta, como ácido propiônico e butírico. Já no suco não-sonicado a produção de AGCC foi menos expressiva. *Rikenellaceae* CR9 produziu ácidos propiônico e butírico na microbiota de camundongos com disbiose induzida por cefixima e tratados com polissacarídeos de espinheiro marítimo (XIE *et al.*, 2023).

A composição da microbiota foi alterada após a fermentação fecal em ambas as amostras para ambos os doadores, com maior aumento na família *Enterobacteriaceae*. As famílias mais abundantes após a fermentação fecal foram *Enterobacteriaceae* e *Bacteroidaceae*. A família *Enterobacteriaceae* tem funções cruciais no intestino humano: ela auxilia na digestão, protege contra patógenos, estimula o sistema imunológico e produz vitaminas essenciais, como vitamina K e complexo B (HOU *et al.*, 2022). A família *Bacteroidaceae* também é importante para o intestino humano pois auxilia na digestão de carboidratos complexos (SENUKOVÁ, 2023). A família *Bacteroidaceae* compete com patógenos no intestino, protegendo contra infecções. Contribuem também para a saúde intestinal, fortalecendo a barreira protetora, prevenindo a inflamação e aumentando a permeabilidade intestinal (ZAFAR; SAIER, 2021).

O equilíbrio e a diversidade das espécies bacterianas no intestino humano são essenciais para a saúde humana. Vale ressaltar que a composição inicial da amostra fecal utilizada para fermentação do SAP-US diferiu daquela utilizada para a amostra SAP, levando a diferenças em sua composição inicial.

A amostra fecal usada para fermentar a amostra de SAP-US apresentou uma menor abundância relativa das famílias *Rikenellaceae* e *Acidaminococcaceae*. Após a fermentação fecal, ambas as famílias aumentaram suas abundâncias relativas. A *Rikenellaceae* desempenha um papel na manutenção da integridade do revestimento intestinal e na promoção de um intestino saudável. Além disso, fermentam a fibra alimentar, produzindo AGCC que fornecem energia e trazem benefícios à saúde. *Rikenellaceae* também tem efeitos regulatórios no sistema imunológico e pode influenciar positivamente na saúde metabólica. (CHENG *et al.*, 2023).

Por outro lado, a família *Acidaminococcaceae* metaboliza aminas, produzindo amônia como subproduto. Sabe-se que desempenham um papel na degradação de compostos nitrogenados e podem influenciar a saúde gastrointestinal e o equilíbrio da microbiota intestinal. Além disso, a família *Acidaminococcaceae* é umas das principais responsáveis pela produção de ácido butírico (TANASE *et al.*, 2020). No entanto, são necessárias mais pesquisas para compreender completamente o papel das *Rikenellaceae* e *Acidaminococcaceae* no intestino humano.

5.1.5.2 Diversidade e riqueza de espécies

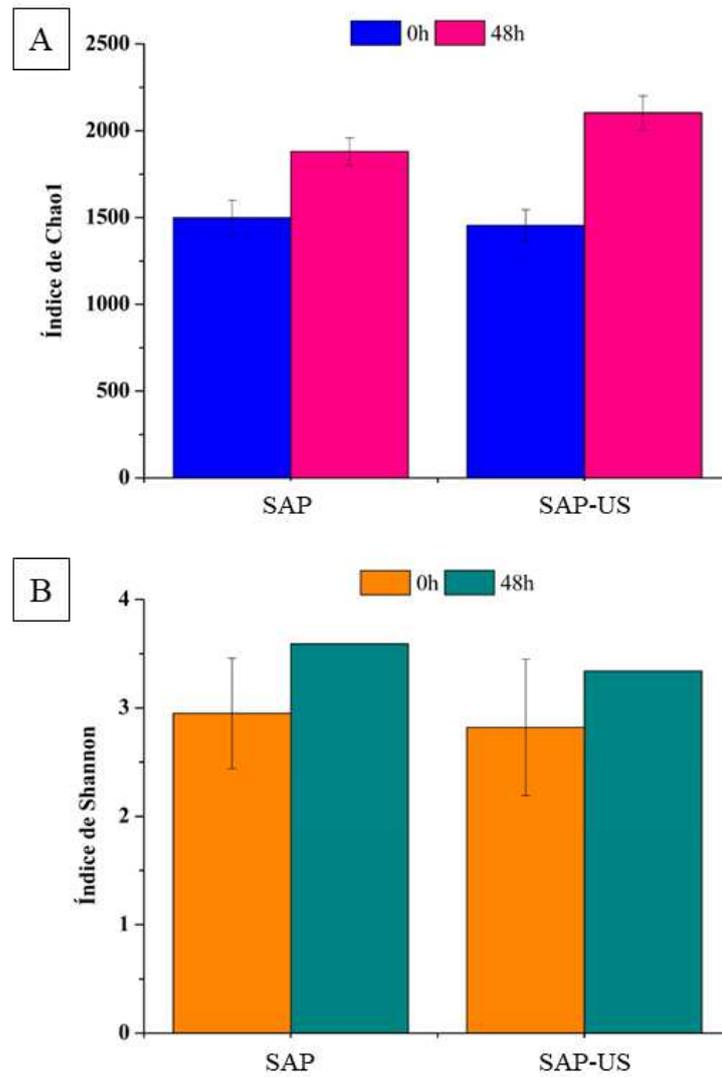
Os parâmetros usados para expressar a Diversidade de espécies bacterianas na microbiota após a fermentação fecal das amostras de suco de açaí SAP e SAP-US foram os índices de Chao1 e Shannon (Figura 17). A riqueza da microbiota estimada pelo índice de Chao1 na fermentação fecal da amostra de suco SAP foi $1499,73 \pm 100,11$ e $1881,11 \pm 79,1$ em 0 e 48 h, respectivamente.

A fermentação fecal do SAP-US apresentou maior índice Chao1 ($2103,37 \pm 98,55$) após 48 h de fermentação. Este resultado indica um aumento no número de espécies após a fermentação fecal. A diversidade microbiana estimada pelo índice de Shannon foi de $2,95 \pm 0,51$ e $3,59 \pm 0,00$ (SAP) e $2,82 \pm 0,63$ e $3,34 \pm 0,00$ (SAP-US) em 0 e 48 h de fermentação fecal, respectivamente. O índice de Shannon indica uma alta abundância de espécies uniformes (KANG *et al.*, 2023). Este resultado revelou que ambos os sucos apresentam aumento da riqueza e diversidade da microbiota e podem contribuir positivamente para a saúde do hospedeiro.

A fermentação pela microbiota intestinal de amostras de polissacarídeos do cogumelo palha (*Volvariella volvacea*) suplementado com FOS mostra uma redução na α -diversidade e nos índices de Chao1 e Shannon, em comparação com a amostra controle (sem fonte extra de carbono) (HU *et al.*, 2023). Da mesma forma, a fermentação fecal do suco de laranja prebiótico também demonstrou redução do índice Chao1 e Shannon (LEITE *et al.*, 2023). A fermentação fecal *in vitro* da fibra dietética solúvel do farelo de trigo aumentou o índice Chao1 de acordo com o tempo de fermentação. No entanto, a diversidade diminuiu drasticamente após 24 h (ZHANG *et al.*, 2023a). Todavia, uma dieta variada com carboidratos

fermentáveis é essencial para diversificar as espécies bacterianas intestinais e, juntamente com a diversidade de metabólitos produzidos, pode melhorar o estado de saúde do hospedeiro (COCKBURN; KOROPATKIN, 2016).

Figura 17 - Estimativa do índice de Chao1 (A) e Shannon (B) para espécies bacterianas antes e após fermentação fecal de suco de açaí prebiótico SAP e SAP-US.



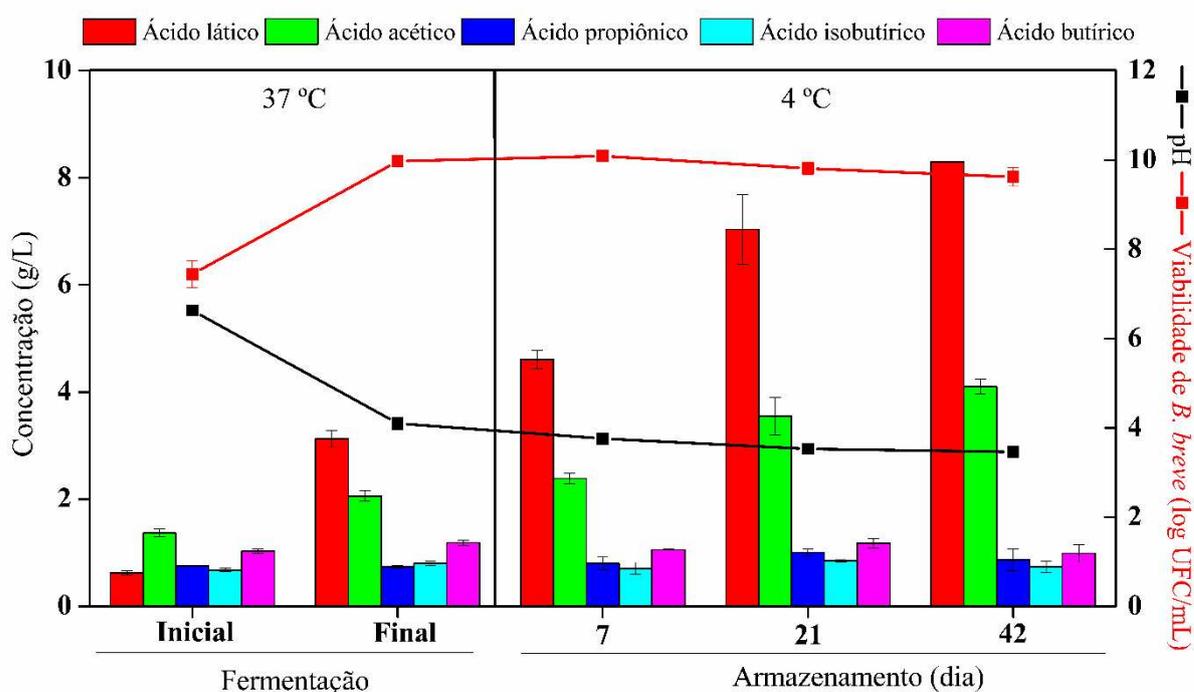
Fonte: Elaborada pela autora.

5.2 Suco de açaí potencialmente simbiótico (SAS)

5.2.1 Fermentação do suco de açaí prebiótico (SAP) por *B. breve* NRRL B-41408

O suco de açaí potencialmente prebiótico (SAP) fermentado por *B. breve*, resultou em um suco de açaí simbiótico (SAS) com viabilidade de 9,97 log UFC/mL (aumento de 2 ciclos log) após 22 h de fermentação a 37 °C (Figura 16). O pH inicial do suco de açaí simbiótico foi adequado para o crescimento de *B. breve*, pois a faixa de pH ideal para o crescimento de *Bifidobacterium* se situa entre 6,0 e 7,0 (PARHI; SONG; CHOO, 2023). Após a fermentação, o pH diminuiu de $6,63 \pm 0,00$ para $4,10 \pm 0,15$ ($p > 0,05$) (Figura 18). Desafios como a acidificação dos meios, observados neste estudo, podem causar lesões celulares. No entanto, os monômeros de frutose presentes durante a fermentação inicial e a suplementação do meio com prebióticos proporcionam nutrientes adicionais que mitigam o impacto das condições adversas (PERRIN *et al.*, 2001).

Figura 18 - Concentração de ácido láctico e ácidos graxos de cadeia curta (g/L), pH e viabilidade de *B. breve* NRRL B-41408 no SAS durante a fermentação (22h/37 °C) e armazenamento (4 °C).

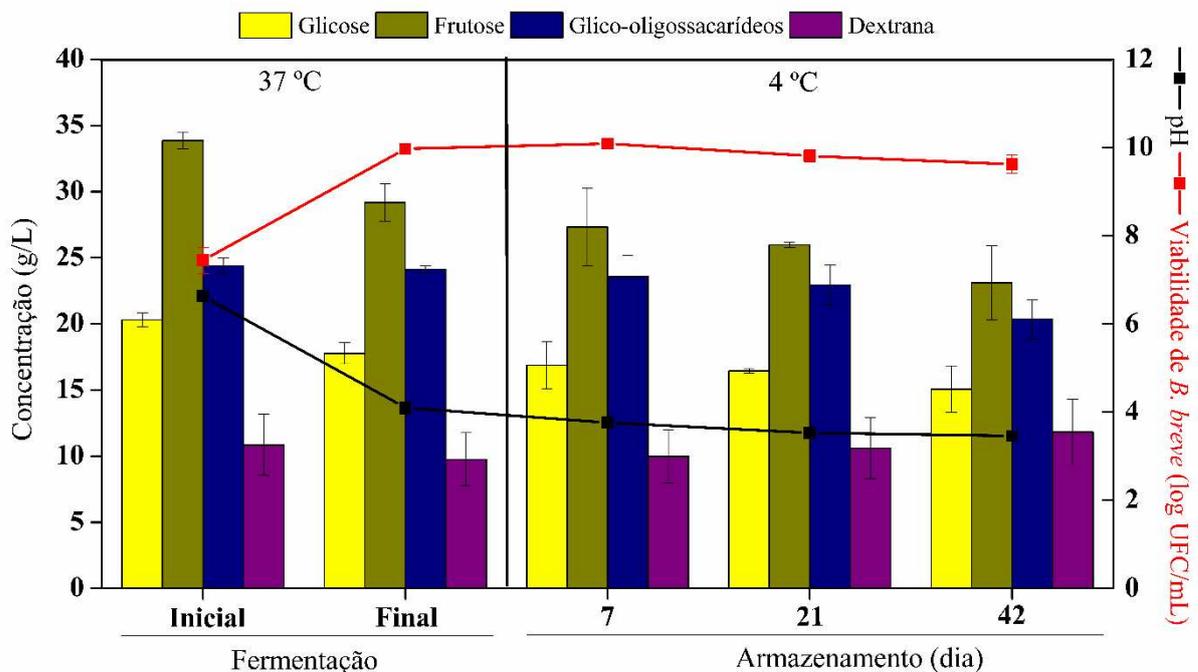


Fonte: Elaborada pela autora.

Após 22 horas de fermentação, as concentrações de ácido láctico e acético aumentaram 400% e 50,36%, respectivamente, atingindo 3,13 e 2,06 g/L (Figura 18). Este resultado é consistente com a redução do pH observado. *B. breve* também produziu ácido isobutírico (0,8 g/L) e butírico (1,19 g/L) na amostra de SAS. Os AGCCs e o ácido láctico são metabólitos primários que podem impactar a composição e a função da microbiota intestinal humana (ZHAO et al., 2019). Embora o ácido láctico não pertença ao grupo dos AGCCs, este ácido pode ser produzido por espécies de *Bifidobacterium*. No entanto, em condições normais, não se acumula no cólon devido à presença de algumas espécies bacterianas, por exemplo, *Eubacterium hallii*, que podem converter o ácido láctico em diferentes AGCCs (MARKOWIAK-KOPEĆ; ŚLIŻEWSKA, 2020).

Observou-se um consumo de 12,46% de glicose e 13,87% de frutose durante a fermentação com *B. breve*, enquanto a dextrana manteve-se constante (Figura 19). Logo, *B. breve* apresentou preferência pelo consumo de glicose e frutose em relação a outras fontes de carbono como a dextrana.

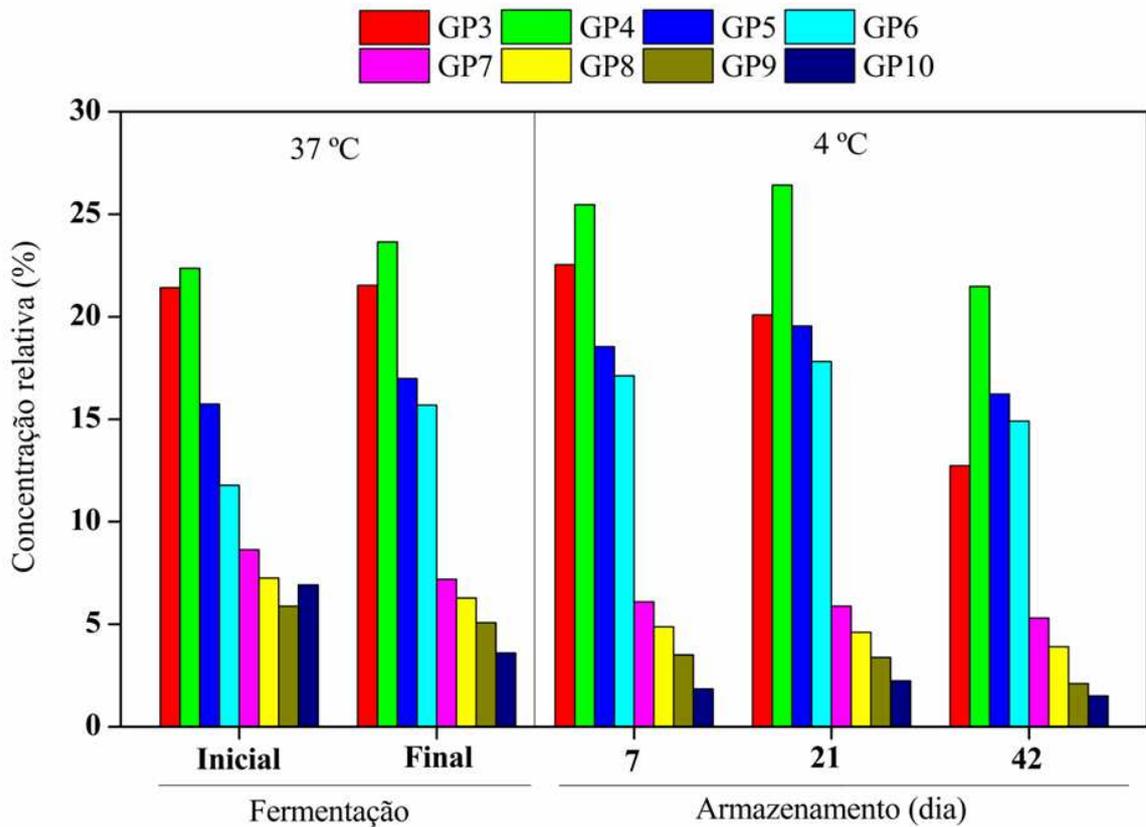
Figura 19 - Concentração de açúcares (g/L), pH e viabilidade de *B. breve* NRRL B-41408 no SAS durante a fermentação (22h/37 °C) e armazenamento (4 °C).



Fonte: Elaborada pela autora.

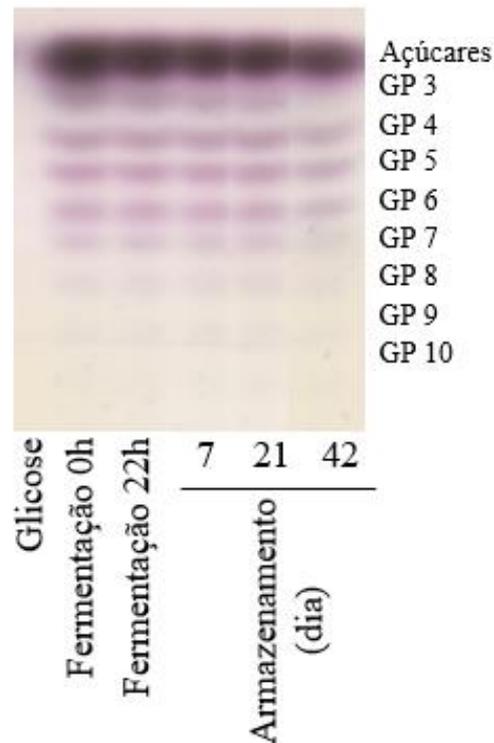
A concentração de glico-oligossacarídeos totais permaneceu constante durante todo o processo de fermentação. No entanto, uma ligeira diminuição na concentração relativa de GP7, GP8 e GP10 e um aumento em GP6, indicando uma possível hidrólise de GPs mais longos em glico-oligossacarídeos de cadeia mais curta (Figura 20 e 21), conforme observado por (LEITE *et al.*, 2021). As bifidobactérias são conhecidas por sua via metabólica única chamada via de derivação bífida ou via da frutose-6-fosfoetolase. Essa via os ajuda a metabolizar hexoses e a produzir enzimas essenciais como a frutose-6-fosfoetolase (ACHI; HALAMI, 2017).

Figura 20 - Concentração relativa de cada grau de polimerização (GP) dos glico-oligossacarídeos no SAS durante a fermentação (37 °C) e o armazenamento a 4°C.



Fonte: Elaborada pela autora.

Figura 21 - Grau de polimerização (GP) dos glico-oligosacarídeos em placa de cromatografia em camada delgada do SAS durante a fermentação (37 °C) e o armazenamento a 4°C.



Fonte: Elaborada pela autora.

5.2.2 Estabilidade do SAS durante o armazenamento refrigerado

Os benefícios dos probióticos para a saúde dependem da quantidade ingerida, sendo a dose diária mínima recomendada definida como 10^9 UFC por dose (XAVIER-SANTOS *et al.*, 2020). Condições de processamento, matriz alimentar, pH, temperatura de armazenamento e oxigênio dissolvido são alguns dos fatores que afetam a viabilidade das bactérias probióticas (ACHI; HALAMI, 2017; MOUSSAVI *et al.*, 2023). Para garantir que os probióticos tenham um número adequado de células viáveis, é fundamental investigar as taxas de viabilidade dos probióticos dentro de um prazo de validade específico (HILL *et al.*, 2014; WENDEL, 2022).

A manutenção da viabilidade de *B. breve* no SAS durante o armazenamento teve o pH baixo como principal fator limitante. Altos níveis de ácidos orgânicos e o baixo pH aumentam a concentração da forma indissociada, indicando a existência de ação combinada em condições ácidas e o efeito antimicrobiano intrínseco dos ácidos (PERRICONE *et al.*, 2015). A partir do 7º dia, houve redução na contagem de células viáveis atingindo o valor de $9,62 \pm 0,21$ log UFC/ml (Figura 18). Apesar da redução da viabilidade durante o período de armazenamento, as contagens de células viáveis de *B. breve* foram superiores a 9,0 log UFC/mL, valor adequado para produtos fermentados contendo probióticos. Uma viabilidade do probiótico adequada para promover efeitos benéficos a saúde no momento do consumo está acima de 6-7 log UFC/mL (VALERO-CASES *et al.*, 2020). Este resultado indica que o armazenamento refrigerado do SAS manteve uma contagem adequada de células viáveis de *B. breve*.

Em 42 dias de armazenamento refrigerado, *B. breve* consumiu frutose (20,78%) e glico-oligossacarídeos (15,59%). Verificou-se que os glico-oligossacarídeos mantiveram sua concentração acima de 20,0 g/L durante os 42 dias de armazenamento, apresentando grau de polimerização até 10 (Figura 19). Dessa forma, os benefícios do consumo desses carboidratos potencialmente prebióticos ao consumidor podem ser obtidos tanto no início quanto no final do armazenamento do suco. Este fato se relaciona com os resultados da fermentação fecal, tendo em vista que independente do dia houve consumo dos glico-oligossacarídeos pela flora intestinal e produção de AGCC.

Ácidos láctico (8,3 g/L) e acético (4,10 g/L) foram produzidos durante o armazenamento, e foi observada uma redução no pH do SAS, indicando que *B. breve* manteve seu metabolismo mesmo em baixas temperaturas. O pH do suco diminuiu ligeiramente após a primeira semana de armazenamento refrigerado e permaneceu constante até o final da estocagem, com valor final de pH de 3,49 (Figura 19). Resultados semelhantes foram observados em suco de sapota-do-Solimões fermentado com *L. casei* B-442 após 15 dias de armazenamento, apresentando aproximadamente 6,0 g/L de ácido láctico (SILVA; CAMPELO; RODRIGUES, 2022).

A concentração de ácido acético aumentou de $2,06 \pm 0,70$ g/L para $4,10 \pm 0,14$ g/L em 42 dias. Langa *et al.* (2020) não observaram aumento acentuado de ácido acético durante a maturação de queijo inoculado com *B. breve* INIA P734. Sensorialmente, a presença de ácido acético em grande quantidade pode afetar negativamente o sabor do produto, diminuindo sua

aceitabilidade. Entretanto, os teores de ácido láctico foram superiores aos de acético, podendo assim melhorar o sabor do suco (PENG *et al.*, 2021). As concentrações de AGCC não sofreram alterações durante o armazenamento refrigerado.

Embora a acidez seja uma condição prejudicial à sobrevivência de *B. breve*, os glico-oligosacarídeos prebióticos e a dextrana podem ter efeito protetor nas células probióticas (SILVA; CAMPELO; RODRIGUES, 2022). Além disso, o armazenamento a frio (4 °C) também pode ter contribuído para a manutenção da viabilidade da cepa probiótica. Kaewarsar *et al.* (2023) sugeriram que os produtos simbióticos devem ser mantidos a 5 ± 3 °C para prolongar a vida útil. Esses achados são consistentes com o estudo realizado por Saarela *et al.* (2006), que relataram que a viabilidade de *B. animalis* subsp. *lactis* E2010 em sucos de frutas (laranja, uva e maracujá) foi significativamente menor quando armazenado a 20 °C em comparação a 4 °C por um período de 6 semanas.

A viabilidade das bifidobactérias pode diminuir durante o armazenamento em diferentes produtos. Guo *et al.* (2024) encontraram uma taxa de sobrevivência de aproximadamente 50% durante um período de armazenamento de 30 dias (4-8°C) em bebidas lácteas fermentadas contendo *B. adolescentis* B8589. Além disso, a adição de *B. adolescentis* melhorou a sobrevivência de *L. paracasei* PC-01 durante a cofermentação do leite. Da mesma forma, a viabilidade de *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* BB-12 no suco de laranja diminuiu após 4 semanas de armazenamento refrigerado (4 °C) (MOUSSAVI *et al.*, 2023).

Sabe-se também que a melhoria na viabilidade das bifidobactérias em produtos fermentados é alcançada pela adição de prebióticos. A viabilidade dos probióticos pode ser aumentada pela combinação com componentes prebióticos que exibem um efeito protetor ou podem levar ao desenvolvimento de condições adequadas para a sobrevivência de microrganismos probióticos. Prebióticos são compostos que promovem o crescimento de microrganismos probióticos atuando como substrato (KAEWARSAR *et al.*, 2023). Verificou-se que o suco de romã probiótico e simbiótico fermentado por *B. animalis* apresentou uma diminuição na viabilidade após 10 dias de armazenamento, mas a viabilidade permaneceu em um nível aceitável (10^6 UFC/mL) no suco simbiótico ao final dos 30 dias (HESAM *et al.*, 2023).

O ácido cítrico permaneceu estável durante o armazenamento do SAS, apresentando $0,80 \pm 0,06$ e $0,81 \pm 0,02$ g/L no início e final da vida de prateleira, respectivamente. É frequentemente utilizado como aditivo alimentar para aumentar a acidez

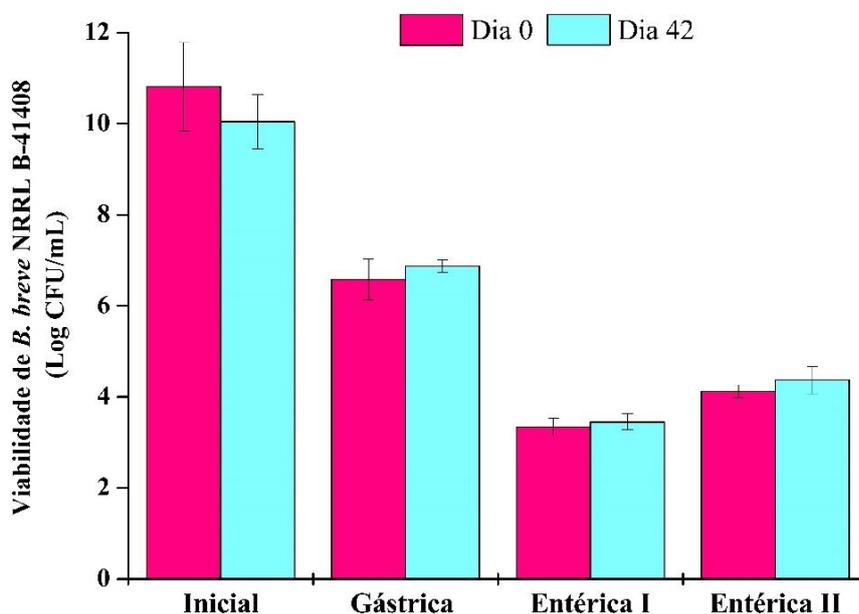
dos alimentos (JIANG *et al.*, 2022) e, juntamente com o ácido ascórbico, podem potencializar a qualidade do suco armazenado, mediante suas características acidulante e antioxidante.

O SAS apresentou $1,77 \pm 0,01$ g/L de ácido ascórbico, mantendo-se estável durante o armazenamento. Este ácido é um importante antioxidante para a nutrição humana, além de ser utilizado como antioxidante em sucos comerciais (SILVEIRA *et al.*, 2022). Alguns estudos relatam a degradação dessa vitamina em sucos de fruta durante o armazenamento refrigerado (ADEBOYEJO *et al.*, 2022; SCHERER; RYBKA; GODOY, 2008). Pereira *et al.* (2013) verificaram menor redução de ácido ascórbico em suco de caju fermentado com *L. casei* NRRL B-442 em comparação ao não fermentado. A manutenção dos ácidos cítrico e ascórbico indica que o *B. breve* não os utilizou como fonte de carbono para sua sobrevivência, visto que o suco apresentava glicose e frutose como substrato durante o armazenamento refrigerado.

5.2.3 Viabilidade de *B. breve* NRRL B-41408 durante a digestão simulada *in vitro*

A sobrevivência e a fixação de bactérias probióticas no epitélio do trato intestinal são importantes para o seu impacto positivo na saúde. Neste estudo, a resistência de *B. breve* às condições gastrointestinais foi avaliada após a fermentação (Dia 0) e ao final do armazenamento refrigerado (Dia 42), conforme mostrado na Figura 22. Não houve diferença significativa na viabilidade entre os dias 0 e 42, indicando que o armazenamento refrigerado do SAS não afetou a viabilidade de *B. breve* durante a digestão simulada *in vitro* após 42 dias de armazenamento.

Figura 22 - Viabilidade de *B. breve* NRRL B-41408 em SAS durante a digestão simulada *in vitro* nos dias 0 e 42 do armazenamento a 4 °C.



Fonte: Elaborada pela autora.

B. breve perdeu viabilidade ao longo das fases de digestão simulada *in vitro* tanto no início quanto no final do armazenamento. Apesar de reduzir a contagem de células viáveis, *B. breve* conseguiu resistir às condições gastrointestinais adversas, atingindo a porção final da fase duodenal com 4,12 e 4,37 log UFC/mL em 0 e 42 dias, respectivamente (Figura 22). Este dado é significativo uma vez que o produto pode ser comercializado com sucesso com viabilidade celular estendida durante o armazenamento refrigerado e manter sua funcionalidade quando ingerido. A quantidade de probióticos que chegam ao cólon é apenas um dos fatores que podem modular a microbiota intestinal. O tipo de dieta é também um fator determinante (LEITE *et al.*, 2023; SWANSON *et al.*, 2020). Para exercer funções benéficas, é essencial que o probiótico mantenha uma contagem mínima viável de aproximadamente 6 log UFC/mL até atingirem seu local ideal de colonização (D'AMICO *et al.*, 2024), ou seja, neste caso o cólon. Todavia, a saúde intestinal não se limita apenas a quantidade do probiótico que alcança o cólon, havendo a possibilidade de quantidades menores de probiótico, sobreviventes a passagem pelo trato gastrointestinal, também resultarem em efeitos positivos a saúde do hospedeiro.

Resultados semelhantes foram observados por Cielecka-piontek *et al.* (2020), que verificaram um decréscimo na viabilidade de *B. breve* DSM 16604 e *B. animalis* subsp. *lactis* durante a digestão simulada *in vitro* de chocolate, porém estes microrganismos não reverteram

sua viabilidade mesmo após as condições serem alteradas para outras mais favoráveis, como o aumento do pH nas fases seguintes da digestão. Em suco simbiótico de sapota-do-Solimões, *L. casei* recuperou sua viabilidade nas fases entéricas I e II (pH 5 e 7), com 8,59 log UFC/mL ao final da digestão simulada (SILVA; CAMPELO; RODRIGUES, 2022).

Kim et al. (2020) relatam que *Lactobacillus* spp. são relativamente mais resistentes as condições gastrointestinais do que *Bifidobacterium* spp. A maioria das espécies de Bifidobactérias não tem boa capacidade de recuperação celular após exposição a ambientes muito ácidos ou com variações frequentes de pH (SOARES *et al.*, 2019). A redução na contagem de células viáveis é esperada durante a passagem pelo trato gastrointestinal, uma vez que o pH baixo, principalmente nas primeiras fases, e a presença de sais biliares tornam o ambiente desfavorável para a sobrevivência de probióticos (COSTA *et al.*, 2017). Alguns autores reforçam que a microencapsulação é uma solução para aumentar a capacidade de sobrevivência de *Bifidobacterium* spp. (KIM *et al.*, 2020; RAJAM; SUBRAMANIAN, 2022).

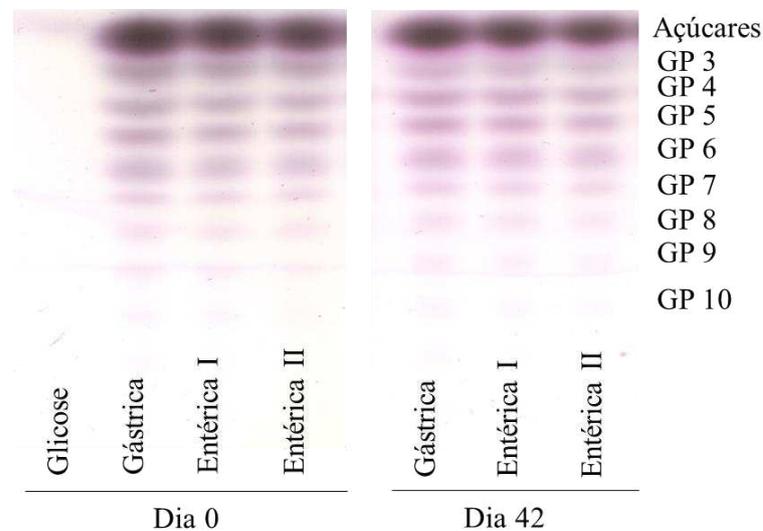
Neste estudo, verificou-se que não houve diferença significativa entre 0 e 42 dias para cada fase da digestão, demonstrando que o armazenamento refrigerado do suco não reduz a funcionalidade de *B. breve*. Estes dados são essenciais, uma vez que o produto pode ser comercializado de forma bem-sucedida em relação à viabilidade celular durante o armazenamento e digestão. Langa *et al.* (2020) avaliaram a viabilidade de *B. breve* em queijo de leite de ovelha após a digestão simulada e encontrou resultados semelhantes ao do presente estudo, na qual obteve viabilidade de $4,97 \pm 0,40$ log UFC/g em 28 dias de armazenamento após a digestão, contudo em 60 dias o probiótico perdeu viabilidade ($1,74 \pm 2,02$ log UFC/g).

Bebida mista probiótica à base de juçara, fruta do mesmo gênero do açaí, morango e banana foi submetida às condições gastrointestinais por meio de simulação *in vitro*. Os probióticos da bebida (*L. casei* e *L. plantarum*) sofreram lesão em suas células quando submetidas ao pH ácido da fase gástrica, mas se recuperam na fase entérica. Contudo, a resistência dessas bactérias ao trato gastrointestinal diminuiu em função do tempo de armazenamento, na qual após 90 dias foi verificada uma redução populacional de *L. plantarum* de 6 log UFC/mL ao final da digestão *in vitro* (RIBEIRO *et al.*, 2020).

Glico-oligossacarídeos, dextrana e açúcares redutores (glicose e frutose) foram avaliados durante digestão simulada *in vitro*. Os dias 0 e 42 significam o primeiro e o último armazenamento refrigerado, respectivamente. A Figura 23 mostra a concentração relativa (%)

do GP dos glico-oligossacarídeos nas amostras de SAS para cada fase da digestão. Os glico-oligossacarídeos foram resistentes às condições gastrointestinais, confirmando que os benefícios destes compostos na saúde dos consumidores podem ser obtidos no início e no final do armazenamento do suco simbiótico.

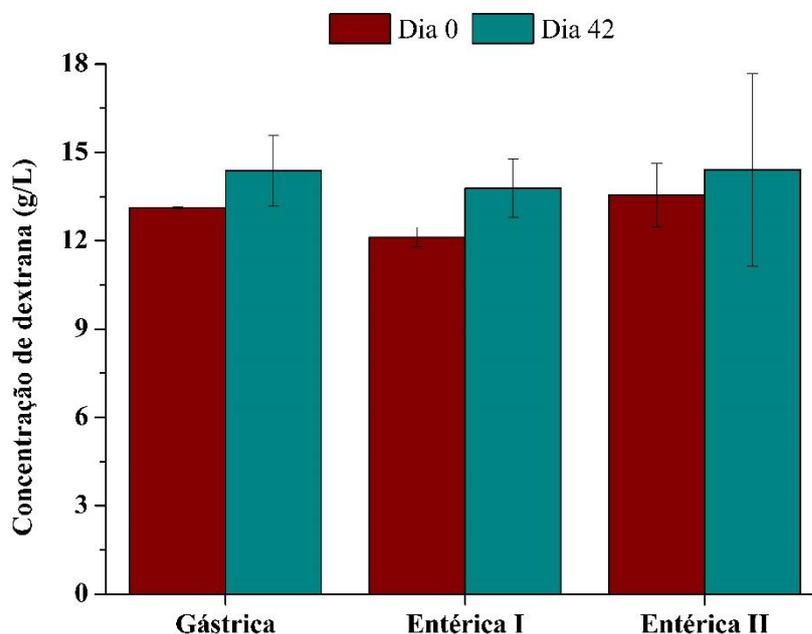
Figura 23 - Grau de polimerização (GP) dos glico-oligossacarídeos em placa de cromatografia de camada delgada em SAS durante a digestão simulada *in vitro* nos dias 0 e 42 do armazenamento a 4 °C.



Fonte: Elaborada pela autora.

A dextrana também foi resistente às condições gastrointestinais durante o armazenamento refrigerado, atingindo $13,5 \pm 1,07$ g/L ao final da digestão simulada *in vitro* (Figura 24). Comportamento semelhante foi observado em suco de laranja contendo glico-oligossacarídeos e dextrana após digestão (LEITE *et al.*, 2023). A resistência da dextrana a acidez gástrica pode ser devida a ligações glicosídicas α -(1→6) (KOTHARI; TINGIRIKARI; GOYAL, 2015). Assim, a dextrana pode atingir o cólon e estimular o crescimento de bactérias benéficas.

Figura 24 - Concentração de dextrana (g/L) em SAS durante a digestão simulada *in vitro* nos dias 0 e 42 do armazenamento a 4 °C.



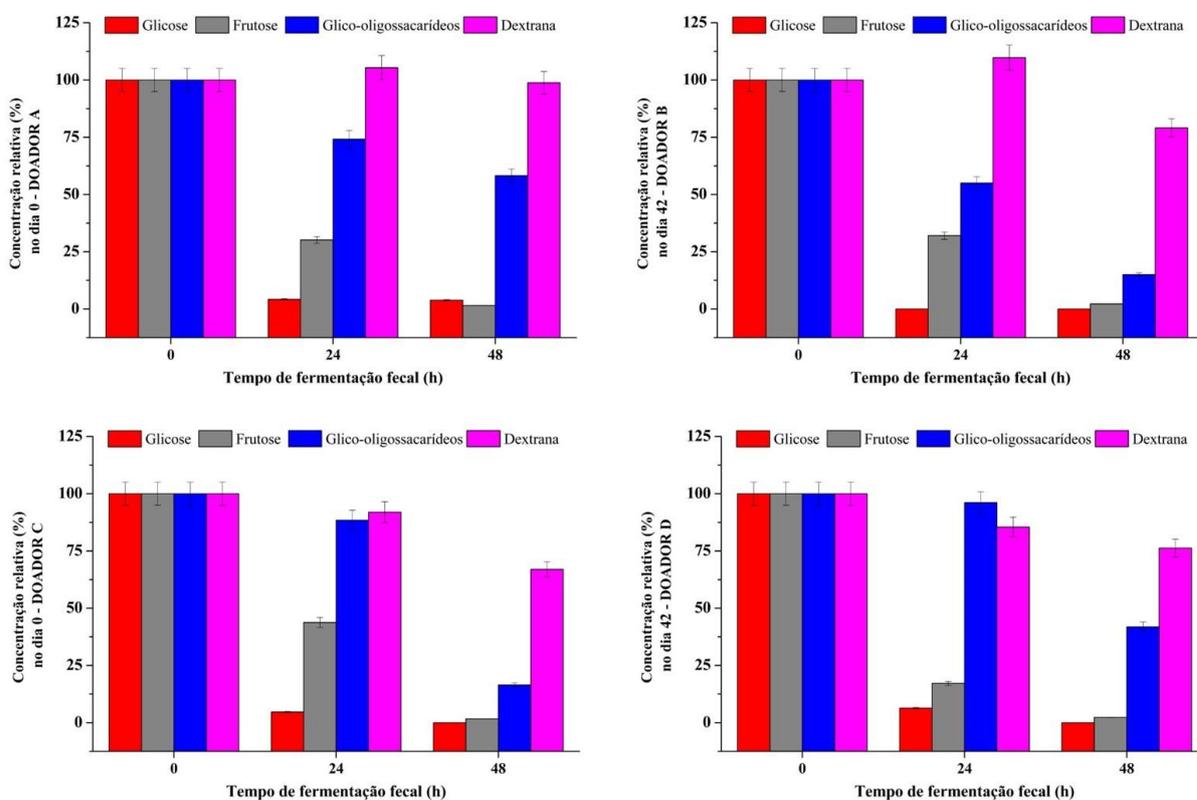
Fonte: Elaborada pela autora.

5.2.4 Fermentação do SAS com inóculo fecal

5.2.4.1 Consumo de açúcares

O consumo de açúcares do SAS pela microbiota fecal dos doadores A, B, C e D está apresentado na Figura 25. Os açúcares redutores foram quase completamente consumidos em 48 h de fermentação pela microbiota intestinal tanto no início quanto no final do armazenamento refrigerado. A microbiota intestinal dos doadores B, C e D, após 48 h de fermentação, consumiram mais de 50% dos glico-oligosacarídeos presentes no SAS em 0 e 42 dias de armazenamento.

Figura 25 - Concentração relativa (%) de glicose, frutose, glico-oligossacarídeos e dextrana durante a fermentação fecal (doadores A, B, C e D) do SAS digerido nos dias 0 e 42 do armazenamento a 4 °C.



Fonte: Elaborada pela autora.

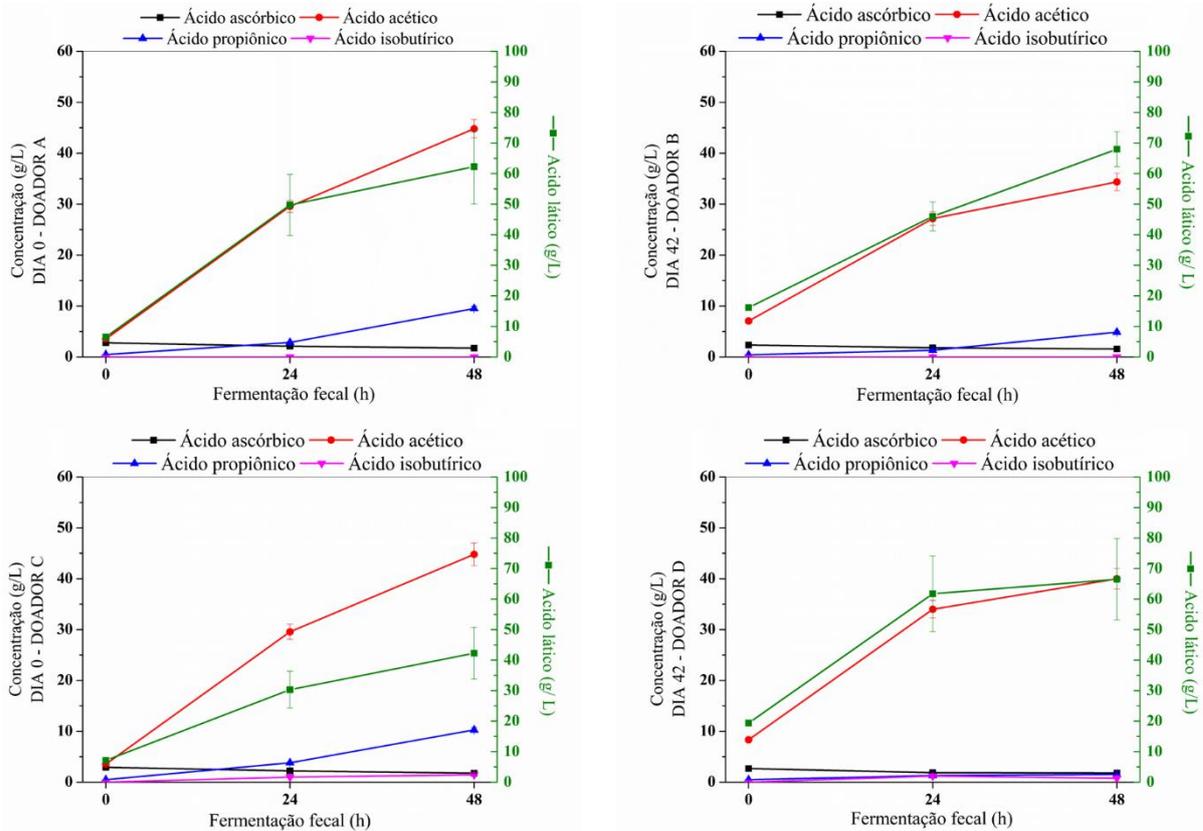
A dextrana foi o componente menos consumido pela microbiota fecal, que pode ser justificado pelo seu maior peso molecular. Contudo, houve consumo (Doadores A= 1,2%; B= 20,92%; C= 33,04%; D= 23,74%) principalmente após 48 horas de fermentação. As diferenças na porcentagem de consumo da dextrana podem ser explicadas por diferenças na composição inicial da microbiota fecal dos doadores, que apesar disso mostrou consumo desse carboidrato. Os microrganismos que residem no cólon diferenciam a utilização de carboidratos baseado em suas características estruturais dentro de uma mistura de classes de carboidratos (TUNCIL *et al.*, 2017). Kothari, Tingirikari e Goyal (2015) reportaram que a dextrana de *L. mesenteroides* NRRL B-1426 estimulou o crescimento de *B. infantis*, *B. animalis* spp. *lactis* e *L. acidophilus*. A fermentação da dextrana pelos probióticos gera grandes quantidades de ácido propiônico e outros metabólitos (KIM *et al.*, 2022). Isto corrobora com os resultados deste estudo, que também mostrou que a fermentação intestinal do SAS produz ácido propiônico.

Após 48 horas de fermentação, os glico-oligossacarídeos apresentaram taxa de consumo significativa (Doadores A= 41,77%; B= 84,99%; C= 83,52%; D= 58,15%). Estes compostos são importantes para o crescimento de bactérias probióticas específicas, particularmente bifidobactérias (GRIMOUD *et al.*, 2010). A ingestão total de fibras recomendada em diferentes países para se alcançar benefícios à saúde, como a manutenção ou redução do colesterol no sangue, modulação da resposta de glicose sérica pós-prandial e proteção contra certas doenças, é de 25 a 35 g/dia para os adultos (STEPHEN *et al.*, 2017). Dessa forma, a concentração de glico-oligossacarídeos e dextrana que alcançam o intestino representam aproximadamente 21 g/250 mL, cuja concentração em um volume de 250 mL pode ser suficiente para resultar em benefícios à saúde.

5.2.4.2 Produção de ácidos orgânicos e ácidos graxos de cadeia curta

A produção de ácidos orgânicos e AGCC após 24 e 48 h de fermentação fecal está ilustrada na Figura 26. Os ácidos graxos de cadeia curta têm papel importante na regulação da barreira intestinal para prevenir a entrada de patógenos ou endotoxinas bacterianas, modulação da resposta inflamatória do sistema imune e ativação do eixo intestino-cérebro, o que pode prevenir doenças cardiovasculares (LU *et al.*, 2022). Os ácidos acético, propiônico e isobutírico foram os principais AGCC produzidos durante a fermentação fecal. Logo após 24 h de fermentação fecal, houve aumento de 764 e 422% na produção de ácido láctico na fermentação das amostras fecais dos doadores A e C, respectivamente, no início do armazenamento do suco (dia 0). Enquanto o ácido acético aumentou em média 842% na fermentação pela microbiota fecal dos doadores A e C. Em contrapartida, um aumento mais acentuado do ácido propiônico foi observado após 48 h de fermentação fecal, tanto no início do armazenamento (doadores A e C) quanto no final do armazenamento do suco (doador B).

Figura 26 - Concentração de ácidos orgânicos e ácidos graxos de cadeia curta (g/L) durante a fermentação fecal (doadores A, B, C e D) do SAS digerido nos dias 0 e 42 do armazenamento a 4 °C.



Fonte: Elaborada pela autora.

Resultados semelhantes foram obtidos por Zhu *et al.* (2021), que avaliando os efeitos reguladores de quatro frações de exopolissacarídeos purificadas de *Lactobacillus rhamnosus* ZFM231 na microflora intestinal de humanos, verificaram maior produção de ácido acético e propiônico em comparação com a fermentação de glicose. Pan, Han e Zhou (2020) associaram a produção de ácidos acético e propiônico à maior população de bifidobactérias após 48 h de fermentação fecal de exopolissacarídeo de *Leuconostoc pseudomesenteroides*.

Os produtos de fermentação de algumas espécies são substratos para fermentação ou incorporados como metabólitos intermediários nas vias metabólicas de outras espécies, resultando em substratos sendo fermentados sequencialmente. Esta relação é conhecida como alimentação cruzada, onde o potencial metabólico dos membros interagentes de uma comunidade pode resultar em alimentação cruzada para benefício mútuo (DÍAZ; GARRIDO, 2024). O ácido láctico, o etanol e o piruvato diminuem pela subsequente utilização bacteriana e

produção de AGCC. Os produtos do catabolismo do açúcar são os AGCC, como ácido acético, propiônico e butírico, que respondem por 85% a 95% do total de AGCC em todas as regiões do cólon. Outros produtos da fermentação, como caproato e valerato, ocorrem em quantidades menores (MARKOWIAK-KOPEĆ; ŚLIŻEWSKA, 2020).

5.2.4.3 Abundância relativa

O efeito do SAS na microbiota intestinal foi estudado usando sequenciamento 16S rRNA do caldo de fermentação fecal. Ao nível do Filo, a microbiota intestinal avaliada foi composta principalmente por *Firmicutes*, *Bacteroidetes* e *Proteobacteria*, com algumas diferenças na abundância relativa de todas as amostras após 48 h de fermentação. O filo Proteobactéria apresentou um aumento na abundância relativa em todas as amostras após 48 h de fermentação. Verificaram-se nos Doador A, B, C e D uma abundância relativa inicial de 5,66, 5,24, 11,85 e 5,23%, respectivamente. Entretanto, após 48 h a abundância aumentou para 55,61, 23,38, 33,17 e 29,76%, nas amostras dos Doadores A, B, C e D, respectivamente.

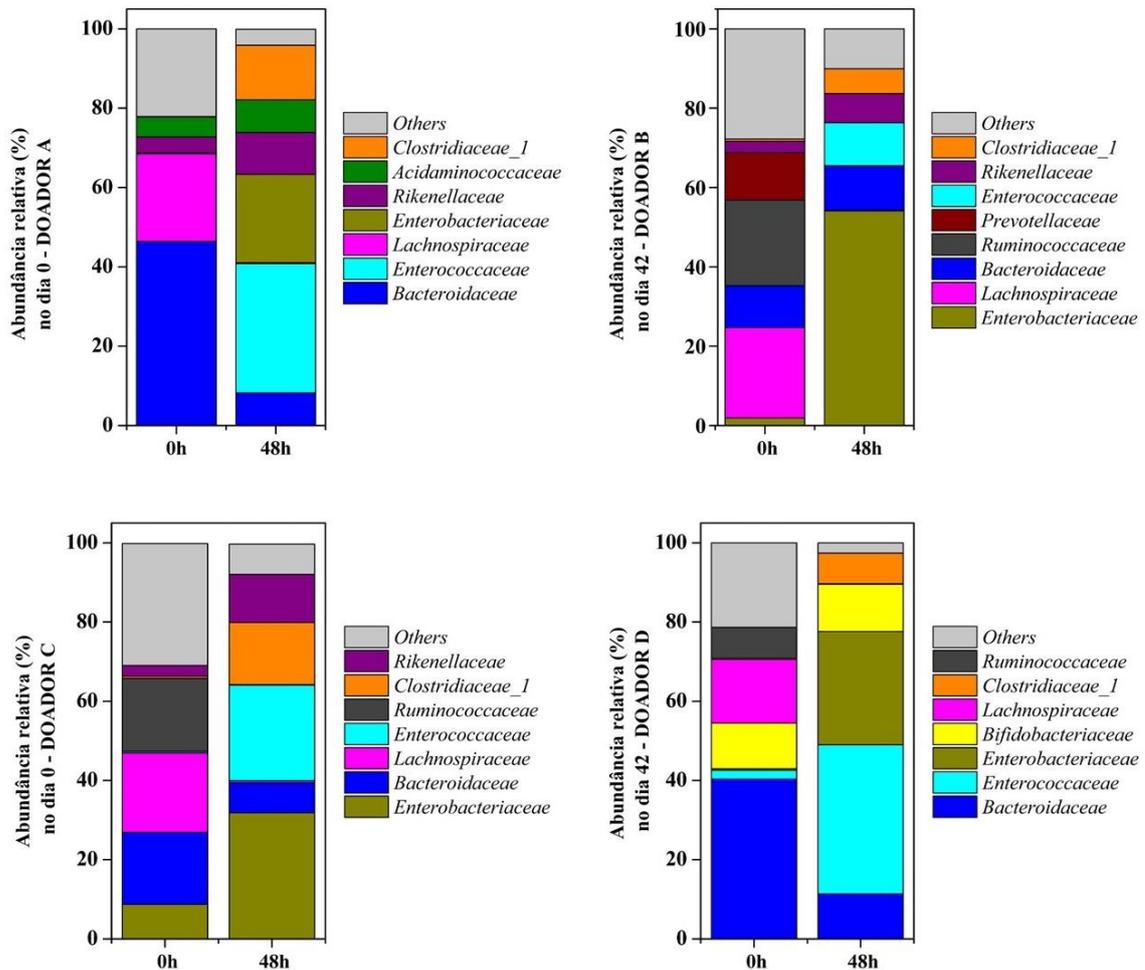
Em 48 h de fermentação fecal, a microbiota intestinal da amostra do Doador B diminuiu a relação de F/B. Enquanto isso, houve aumento na proporção de *Firmicutes* para *Bacteroidetes* (F/B) na microbiota dos Doadores A, C e D. *Firmicutes* e *Bacteroidetes* são os principais filos bacterianos que constituem a microbiota humana (KAPOOR *et al.*, 2023).

A relação F/B é um índice importante para avaliar alterações na microbiota intestinal. O desequilíbrio da microbiota intestinal pelo aumento da relação F/B pode representar alguns distúrbios gastrointestinais, como doença celíaca e sensibilidade não celíaca ao trigo (NASERI *et al.*, 2023). No entanto, uma elevada relação F/B pode ser atribuída a condições saudáveis. Foi relatado que uma relação de abundância F/B diminuída representa um distúrbio microbiano. A F/B pode influenciar a inflamação do hospedeiro, na qual a inflamação crônica a longo prazo está associada à incidência e ao desenvolvimento de câncer (ZHANG *et al.*, 2024). Além disso, a fermentação dos prebióticos pela microbiota produziu AGCC, principalmente os ácidos acético e propiônico, que podem inibir a liberação de fatores inflamatórios (CHEN *et al.*, 2023).

A composição da microbiota intestinal mostrou elevada abundância relativa das famílias *Enterococcaceae* e *Enterobacteriaceae* após a fermentação fecal (Figura 27). *Bacteroidaceae* diminuiu na microbiota de A, C e D, com diminuições acentuadas de *B. dorei* nos doadores A e D. Espécies como *B. dorei* e *B. fluxus* foram associadas à síndrome do intestino irritável, distúrbio que envolve o desequilíbrio da microbiota intestinal (JACOBS *et al.*, 2023).

A presença do probiótico *B. breve* NRRL B-41408 no SAS produzido também pode ter efeito nas alterações da microbiota intestinal das amostras avaliadas. Chen *et al.* (2021), avaliou a administração oral de *B. breve* em camundongos com colite induzida por DSS (Dextran Sulfato de Sódio) e verificou que o gênero *Bacteriodes* diminuiu e *Odoribacter* aumentou.

Figura 27 - Abundância relativa (%) da microbiota intestinal de quatro doadores (A, B, C e D) em nível taxonômico de família antes e após a fermentação fecal do suco de açaí potencialmente simbiótico digerido nos dias 0 e 42 do armazenamento a 4 °C.



Fonte: Elaborada pela autora.

A fermentação fecal do SAS digerido reduziu notavelmente a abundância relativa da família *Lachnospiraceae* chegando a valores entre 0,13 e 0,50%, após 48 h. Efeitos semelhantes foram observados por Leite *et al.* (2023) em fermentação colônica de suco de laranja digerido contendo glico-oligossacarídeos e dextrana.

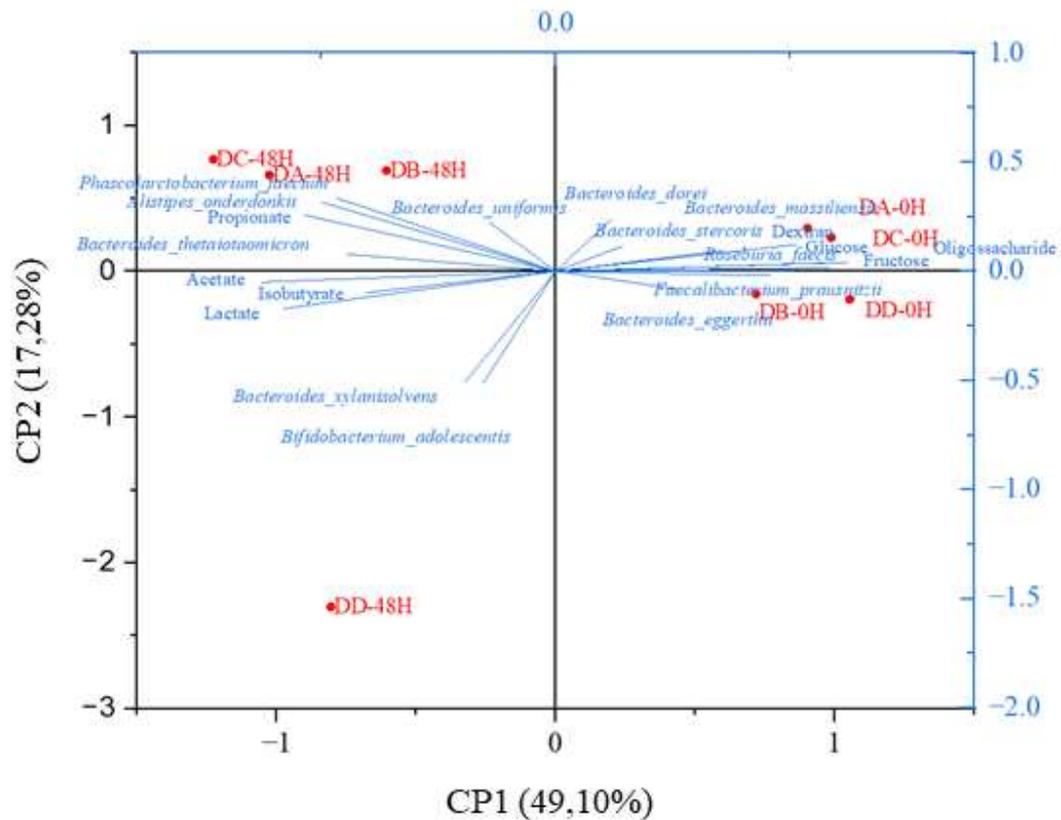
Neste estudo, houve um aumento na abundância relativa da família *Rikenellaceae* após 48 h de fermentação fecal (Doadores A, B e C). A família *Rikenellaceae* foi associada à melhora da absorção de antioxidantes e produção de AGCC em pesquisas *in vivo* (SHI *et al.*, 2023). Os autores reportam que o aumento na abundância relativa de *Rikenellaceae* na microbiota intestinal de ratos administrados com polissacarídeos foi correlacionada positivamente com a melhora da absorção de β -caroteno e produção de AGCC.

A análise de componentes principais (ACP) foi realizada para verificar a influência do SAS na composição da microbiota de amostras fecais humanas. Na Figura 28 está apresentado o gráfico de *scores* e *loadings* e os componentes principais (CP) 1 e 2 foram utilizados para classificar as amostras. CP1 e CP2 explicaram 49,1% e 17,28%, respectivamente, da variância total dos dados (total de 66,38%).

CP1 mostra a microbiota dos doadores antes da fermentação (0h) e a composição após a fermentação (48h), discriminando a microbiota de acordo com o tempo de fermentação. Altas concentrações de lactato, acetato, propionato e isobutirato foram diretamente correlacionadas com as maiores concentrações de *Phascolarctobacterium faecium*, *Alistipes onderdonkii*, *Bacteroides thetaiotaomicron*, *Bacteroides uniformis*, *Bacteroides xylanisolvens*, *Bifidobacterium adolescentis*, após 48h de fermentação fecal.

Em CP2 observa-se que altas concentrações de lactato, acetato e isobutirato estão diretamente correlacionadas com a presença de *B. adolescentis*. Esses ácidos são os principais metabólitos da microbiota intestinal, produzidos especialmente por Bifidobactérias (CHEN *et al.*, 2023). Além disso, alta concentração de propionato se correlaciona diretamente com a alta abundância de espécies de *Bacteroides*, tais como *Bacteroides thetaiotaomicron*, *Bacteroides uniformis*, *Bacteroides xylanisolvens*, *Bacteroides dorei*, *Bacteroides stercoris*, *Bacteroides massiliensis*. *Bacteroides spp.* são associados a produção de propionato (LU *et al.*, 2022).

Figura 28 – Análise de componentes principais na avaliação dos efeitos do SAS digerido antes (0h) e após a fermentação (48h) de espécies da microbiota intestinal de quatro doadores (A, B, C e D).



Fonte: Elaborada pela autora.

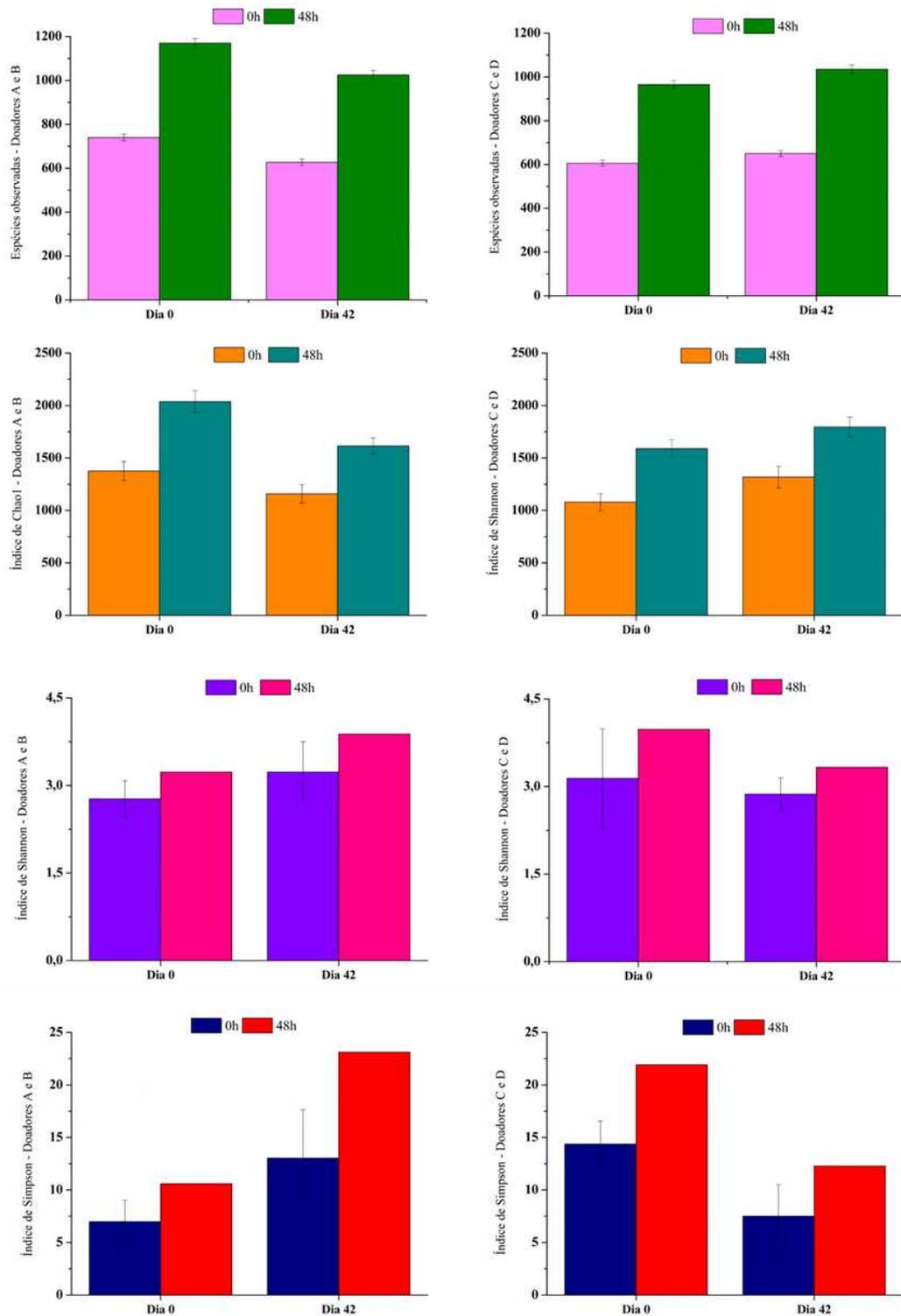
A produção de AGCC está associada com efeitos benéficos a saúde do hospedeiro, conforme algumas pesquisas. Por exemplo, Chen *et al.* (2023) reportam que a composição da microbiota e os níveis séricos de AGCC, em especial o ácido isobutírico, podem ser fundamentais no tratamento de câncer de pulmão, na qual o ácido isobutírico inibiu eficazmente o progresso da doença. Os AGCC são conhecidos por seus efeitos anti-inflamatórios, podendo assim contribuir para a prevenção e tratamento de doenças.

5.2.4.4 Diversidade e riqueza de espécies

A diversidade de espécies foi calculada em 0 e 48 h de fermentação fecal das amostras de SAS. Entre os índices de diversidade α , os índices de espécies observadas e Chao1 refletem principalmente a riqueza da comunidade amostral, e os índices de Shannon e Simpson

refletem a diversidade da comunidade amostral. O SAS aumentou a comunidade bacteriana indicada pelo aumento nas espécies observadas e o aumento do índice de Shannon para todas as amostras. O índice de Shannon aumentou 116,6%, 117,2%, 125,15% e 116,02% na microbiota intestinal de A, B, C e D após 48 horas de fermentação, respectivamente. O aumento no índice de Shannon e Simpson pode ser explicado pelo aumento na abundância relativa da família *Enterobacteriaceae* e *Enterococaceae* (Figura 27), bem como pelo crescimento de espécies de *Bacteroides* (Figura 28). A comparação dos dados entre os quatro grupos sugere que a riqueza e a diversidade da microbiota intestinal foram significativamente melhoradas pelo SAS. (Figura 29).

Figura 29 – Espécies observadas e índices de Chao1, Shannon e Simpson da microbiota intestinal de quatro doadores (A, B, C e D) em nível taxonômico de família antes (0h) e após (48h) a fermentação fecal do SAS digerido nos dias 0 e 42 do armazenamento a 4 °C.



Fonte: Elaborada pela autora.

A diversidade de espécies da microbiota intestinal possui uma relação inversamente proporcional a suscetibilidade a certas doenças (CHEN *et al.*, 2023). Por exemplo, o índice de diversidade de espécies avaliados na fermentação fecal em indivíduos com doença inflamatória intestinal crônica foi menor do que na fermentação fecal saudável (PENG *et al.*, 2021). Dessa forma, a fermentação fecal com SAS melhorou a diversidade da microbiota e pode contribuir no equilíbrio da microbiota intestinal.

6 CONCLUSÃO

Neste estudo, foi possível realizar a síntese de glico-oligossacarídeos diretamente no suco de açaí a partir da enzima dextrana-sacarase de *Leuconostoc mesenteroides* B512 F, provendo a formação de glico-oligossacarídeos com grau de polimerização até 10. Os glico-oligossacarídeos e a dextrana formados no suco de açaí foram resistentes à digestão simulada *in vitro* e foram consumidos principalmente pela microbiota intestinal durante a fermentação do suco sonificado. Os principais metabólitos produzidos foram os ácidos láctico e os AGCC (acético, propiônico e butírico) após a fermentação fecal do SAP-US. A amostra de SAP-US também promoveu o desenvolvimento de bactérias produtoras de AGCC, especialmente os ácidos propiônico e butírico. Além disso, o suco prebiótico melhorou a riqueza e a diversidade da microbiota intestinal, o que pode contribuir para a saúde geral do hospedeiro apoiado no potencial prebiótico do suco elaborado. Verificou-se ainda que o suco de açaí é uma matriz adequada para o desenvolvimento de uma bebida simbiótica. O SAP fornece os nutrientes necessários para o crescimento de *B. breve* NRRL B-41408. A viabilidade dos probióticos foi confirmada acima de 9,0 log UFC/mL após a fermentação e durante o armazenamento refrigerado (42 dias). Isto indica que o suco de açaí é uma opção não láctea viável para transportar probióticos. Durante o armazenamento refrigerado, os probióticos não consumiram os glico-oligossacarídeos e a dextrana, garantindo as características prebióticas durante toda a vida útil do suco. Os glico-oligossacarídeos foram consumidos pela microbiota intestinal, produzindo AGCC (ácidos acético, propiônico e isobutírico), independentemente do tempo de armazenamento refrigerado. O SAS pode ser considerado um alimento funcional que melhora o ambiente intestinal, aumentando a diversidade e a riqueza das espécies da microbiota intestinal.

REFERÊNCIAS

- ABDOLALIPOUR, E. *et al.* Evaluation of the antitumor immune responses of probiotic *Bifidobacterium bifidum* in human papillomavirus-induced tumor model. **Microbial Pathogenesis**, v. 145, p. 1-8, 2020.
- ABE SATO, S. T. *et al.* Isolation and Genetic Identification of Endophytic Lactic Acid Bacteria From the Amazonian Açai Fruits: Probiotics Features of Selected Strains and Their Potential to Inhibit Pathogens. **Frontiers in Microbiology**, v. 11, p. 1-13, 2021.
- ACHI, S. C. *et al.* Dark chocolate: delivery medium for probiotic *Bifidobacterium breve* NCIM 5671. **Journal of Food Science and Technology**, v. 61, n. 7, p. 1411–1415, 2024.
- ACHI, S. C.; HALAMI, P. M. Bifidobacterial probiotics through fermented foods. Em: **Mining of Microbial Wealth and MetaGenomics**, p. 267–285, 2017.
- ADEBOYEJO, F. O. *et al.* Changes in quality parameters and microbial stability of hog plum (*Spondias mombin* Linn.) juice during ambient and refrigerated storage. **Nutrition and Food Science**, v. 52, n. 6, p. 958–970, 2022.
- AGUS, A.; CLÉMENT, K.; SOKOL, H. Gut microbiota-derived metabolites as central regulators in metabolic disorders. **Gut**, v. 70, p. 1174–1182, 2021.
- AL ZHRANI, A. J.; SHORI, A. B. Improve the antioxidant activity and viability of *B. longum* and *B. animalis* subsp *lactis* in fermented soy and almond milk. **Food Science and Technology**, v. 43, p. 1-10, 2023.
- ALMADA-ÉRIX, C. N. *et al.* Development of a semi-dynamic *in vitro* model and its testing using probiotic *Bacillus coagulans* GBI-30, 6086 in orange juice and yogurt. **Journal of Microbiological Methods**, v. 183, p. 1-6, 2021.
- ALMEIDA, E. I. B. *et al.* Análise biométrica e físico-química de frutos de açaizeiros cultivados no Brejo paraibano. **Tecnol. & cienc. agropec.**, v. 5, n. 2, p. 1–4, 2011.
- ALMEIDA, F. D. L. *et al.* Effects of atmospheric cold plasma and ozone on prebiotic orange juice. **Innovative Food Science and Emerging Technologies**, v. 32, p. 127–135, 2015.
- ALMEIDA, F. D. L. *et al.* Fructooligosaccharides integrity after atmospheric cold plasma and high-pressure processing of a functional orange juice. **Food Research International**, v. 102, p. 282–290, 2017.
- ALQURASHI, R. M. *et al.* *In vitro* approaches to assess the effects of açai (*Euterpe oleracea*) digestion on polyphenol availability and the subsequent impact on the faecal microbiota. **Food Chemistry**, v. 234, p. 190–198, 2017.
- ALVES FILHO, E. G. *et al.* Evaluation of thermal and non-thermal processing effect on non-prebiotic and prebiotic acerola juices using 1H qNMR and GC–MS coupled to chemometrics. **Food Chemistry**, v. 265, p. 23–31, 2018.

AMORIM, C. *et al.* *In vitro* assessment of prebiotic properties of xylooligosaccharides produced by *Bacillus subtilis* 3610. **Carbohydrate Polymers**, v. 229, p. 115460, 2020.

ANDRADE, R. M. S. DE *et al.* Potential prebiotic effect of fruit and vegetable byproducts flour using *in vitro* gastrointestinal digestion. **Food Research International**, v. 137, p. 109354, 2020.

ARAÚJO, A. D. A. *et al.* Production and spouted bed drying of acerola juice containing oligosaccharides. **Food and Bioproducts Processing**, v. 94, p. 565–571, p. 565–571, 2015.

ASLAM, R. *et al.* A chemometric approach to evaluate the effects of probe-type ultrasonication on the enzyme inactivation and quality attributes of fresh amla juice. **Ultrasonics Sonochemistry**, v. 92, p. 1-11, 2023.

BARBOSA, P. O. *et al.* Açai (*Euterpe oleracea* Mart.) pulp dietary intake improves cellular antioxidant enzymes and biomarkers of serum in healthy women. **Nutrition**, v. 32, n. 6, p. 674–680, 2016.

BARBOSA, P. O. *et al.* Açai (*Euterpe oleracea* Martius) supplementation in the diet during gestation and lactation attenuates liver steatosis in dams and protects offspring. **European Journal of Nutrition**, v. 59, n. 5, p. 1895–1908, 2020.

BARUAH, R.; DEKA, B.; GOYAL, A. Purification and characterization of dextransucrase from *Weissella cibaria* RBA12 and its application in *in vitro* synthesis of prebiotic oligosaccharides in mango and pineapple juices. **LWT**, v. 84, p. 449–456, 2017.

BINDELS, L. B. *et al.* Opinion: Towards a more comprehensive concept for prebiotics. Nature Reviews Gastroenterology and Hepatology. **Nature Publishing Group**, 22 maio 2015.

BUNIEWSKA, M. *et al.* Bioaccessibility of bioactive compounds after non-thermal processing of an exotic fruit juice blend sweetened with *Stevia rebaudiana*. **Food Chemistry**, v. 221, p. 1834–1842, 2017.

CARBONELL-CAPELLA, J. M. *et al.* Analytical methods for determining bioavailability and bioaccessibility of bioactive compounds from fruits and vegetables: A review. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, v. 13, n. 2, p. 155–171, 2014.

CARDOSO, C. *et al.* Bioaccessibility assessment methodologies and their consequences for the risk-benefit evaluation of food. **Trends in Food Science and Technology**, v. 41, p. 5-23, 2015.

CARVALHO, A. V. *et al.* Chemical composition and antioxidant capacity of açai (*Euterpe oleracea*) genotypes and commercial pulps. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 97, n. 5, p. 1467–1474, 2016.

CARVALHO, L. M. DE S. *et al.* Improvement of the bioaccessibility of bioactive compounds from Amazon fruits treated using high energy ultrasound. **Ultrasonics Sonochemistry**, v. 67, p. 1-11, 2020.

CHAO, A.; BUNGE, J. Estimating the number of species in a stochastic abundance model. **Biometrics**, v. 58, n. 3, p. 531–539, 2002.

CHAVES, J. O. *et al.* Extraction of Flavonoids From Natural Sources Using Modern Techniques. **Frontiers in Chemistry**, v. 8, p. 1-25, 2020.

CHEN, C. *et al.* Prebiotic effect of sialylated immunoglobulin G on gut microbiota of patients with inflammatory bowel disease by *in vitro* fermentation. **Food Bioscience**, v. 52, p. 1–13, 2023.

CHEN, L.; KARBOUNE, S. Prebiotics in Food and Health: Properties, Functionalities, Production, and Overcoming Limitations With Second-Generation Levan-Type Fructooligosaccharides. **Encyclopedia of Food Chemistry**, p. 271–279, 2019.

CHEN, Y. *et al.* Alleviation effects of *Bifidobacterium breve* on DSS-induced colitis depends on intestinal tract barrier maintenance and gut microbiota modulation. **European Journal of Nutrition**, v. 60, n. 1, p. 369–387, 2021.

CHEN, Z. H. *et al.* Characterization and prebiotic potential of polysaccharides from *Rosa roxburghii* Tratt pomace by ultrasound-assisted extraction. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 268, p. 1-13, 2024.

CHENG, S. *et al.* The Probiotic Combination of *Lactocaseibacillus paracasei* JY062 and *Lactobacillus gasseri* JM1 Alleviates Gastrointestinal Motility Disorder via Improving Gut Microbiota. **Nutrients**, v. 15, n. 4, p. 1-17, 2023.

CIANCIOSI, D. *et al.* The reciprocal interaction between polyphenols and other dietary compounds: Impact on bioavailability, antioxidant capacity and other physico-chemical and nutritional parameters. **Food Chemistry**, v. 375, p. 1-13, 2022.

CIELECKA-PIONTEK, J. *et al.* Survival of commercial probiotic strains and their effect on dark chocolate synbiotic snack with raspberry content during the storage and after simulated digestion. **Electronic Journal of Biotechnology**, v. 48, p. 62–71, 2020.

COCKBURN, D. W.; KOROPATKIN, N. M. Polysaccharide Degradation by the Intestinal Microbiota and Its Influence on Human Health and Disease. **Journal of Molecular Biology**, 428, n. 16, p. 3230-3252, 2016.

COELHO, R. M. D. *et al.* Powder lemon juice containing oligosaccharides obtained by dextransucrase acceptor reaction synthesis and dehydrated in sprouted bed. **Journal of Food Science and Technology**, v. 52, n. 9, p. 5961–5967, 2015.

COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO - CONAB. **Açaí (fruto)**. 2019. Disponível em: <<https://www.sunoresearch.com.br/artigos/verticalizacao/>>.

COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO - CONAB. **Açaí (fruto)**. 2020.

COMPANHIA NACIONAL DO ABASTECIMENTO. **Boletim da Sociobiodiversidade**. Brasília. n. 1, p. 1-36, mar. 2022.

COSTA, M. G. M. *et al.* Synbiotic Amazonian palm berry (açai, *Euterpe oleracea* Mart.) ice cream improved *Lactobacillus rhamnosus* GG survival to simulated gastrointestinal stress. **Food and Function**, v. 8, n. 2, p. 731–740, 2017.

CRITTENDEN, R. G.; PLAYNE, M. J. Production, properties and applications of food-grade oligosaccharides. **Trends in Food Science & Technology**, v. 7, p. 353–361, 1996.

CUI, R.; ZHU, F. Effect of ultrasound on structural and physicochemical properties of sweetpotato and wheat flours. **Ultrasonics Sonochemistry**, v. 66, p. , 2020.

CUI, Y. *et al.* Dual-directional regulation of spinal cord injury and the gut microbiota. **Neural Regeneration Research**, v. 19, n. 3, p. 548–556, 2024.

CUNNINGHAM, M. *et al.* Shaping the Future of Probiotics and Prebiotics. **Trends in Microbiology**, v. 1, p. 1–19, 2021.

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

DA SILVA, D. C. G. *et al.* Consumption of sweetened beverages and associated factors in adults. **Ciência e Saúde Coletiva**, v. 24, n. 3, p. 899–906, 2019.

DA SILVA, E. S.; NUNES, A. O.; HOSKIN, R. T. Ultrasound-assisted polyphenol extraction of acerola and jambolan pomaces: comparison of extraction protocols, kinetic modeling, and life cycle assessment. **Chemical Engineering and Processing - Process Intensification**, v. 191, 2023.

DA SILVA, I. M.; RABELO, M. C.; RODRIGUES, S. Cashew juice containing prebiotic oligosaccharides. **Journal of Food Science and Technology**, v. 51, n. 9, p. 2078–2084, 2014.

D'AMICO, V. *et al.* Multistimuli responsive microcapsules produced by the prilling/vibration technique for targeted colonic delivery of probiotics. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 658, p. 1-13, 2024.

DE VUYST, L. *et al.* Summer Meeting 2013: Growth and physiology of bifidobacteria. **Journal of Applied Microbiology**, v. 116, n. 3, p. 477-491, 2014.

DEHKOHNEH, A.; JAFARI, P.; FAHIMI, H. Effects of probiotic *Lactobacillus paracasei* TD3 on moderation of cholesterol biosynthesis pathway in rats. **Iranian Journal of Basic Medical Sciences**, v. 22, n. 9, p. 1004–1009, 1 jun. 2019.

DI RIENZI, S. C.; BRITTON, R. A. Adaptation of the Gut Microbiota to Modern Dietary Sugars and Sweeteners. **Advances in Nutrition**, v. 11, n. 3, p. 616-629, 2020.

DÍAZ, R.; GARRIDO, D. Screening competition and cross-feeding interactions during utilization of human milk oligosaccharides by gut microbes. **Microbiome Research Reports**, v. 3, n. 1, 1 jan. 2024.

DO CARMO, M. C. L.; DANTAS, M. I. DE S.; RIBEIRO, S. M. R. Caracterização do mercado consumidor de sucos prontos para o consumo. **Campinas**, v. 17, n. 4, p. 305–309, 2014.

DOLAS, R.; SARAVANAN, C.; KAUR, B. P. Emergence and era of ultrasonic's in fruit juice preservation: A review. **Ultrasonics Sonochemistry**, v. 58, p. 1-13, 2019.

DUBOIS, M. *et al.* **Colorimetric Method for Determination of Sugars and Related Substances**. 1956. Disponível em: <<https://pubs.acs.org/sharingguidelines>>.

FACHI, J. L. *et al.* Butyrate Protects Mice from Clostridium difficile-Induced Colitis through an HIF-1-Dependent Mechanism. **Cell Reports**, v. 27, n. 3, p. 750- 761, 2019.

FARAG, M. A. *et al.* Metabolomics reveals impact of seven functional foods on metabolic pathways in a gut microbiota model. **Journal of Advanced Research**, v. 23, p. 47–59, 2020.

FOLIN, O.; CIOCALTEU, V. On Tyrosine and Tryptophane Determinations in Proteins. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 73, n. 2, p. 627–560, 1927.

FONTELES, T. V. *et al.* Ultrasound and ozone processing of cashew apple juice: effects of single and combined processing on the juice quality and microbial stability. **Processes**, v. 9, n. 12, p. 1-14, 2021.

FONTELES, T. V.; RODRIGUES, S. Prebiotic in fruit juice: processing challenges, advances, and perspectives. **Current Opinion in Food Science**, v. 22, p. 55-61, 2018.

FREITAS, H. V. *et al.* Synbiotic açai juice (*Euterpe oleracea*) containing sucralose as noncaloric sweetener: Processing optimization, bioactive compounds, and acceptance during storage. **Journal of Food Science**, v. 86, n. 3, p. 730–739, 2021.

GALLO, M.; FERRARA, L.; NAVIGLIO, D. Application of ultrasound in food science and technology: A perspective. **Foods**, v. 7, n. 164, p. 1-18, 2018.

GAO, X. *et al.* *Bifidobacterium breve* modulates lactic acid to curtail *Escherichia coli* expansion and alleviate inflammatory bowel disease. **Food Bioscience**, v. 61, p. 1-12, 2024.

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

- GOMES, W. F. *et al.* Effect of ultrasound followed by high pressure processing on prebiotic cranberry juice. **Food Chemistry**, v. 218, p. 261–268, 2017.
- GONÇALVES, A.; ESTEVINHO, B. N.; ROCHA, F. Methodologies for simulation of gastrointestinal digestion of different controlled delivery systems and further uptake of encapsulated bioactive compounds. **Trends in Food Science and Technology**, v. 114, p. 510-520, 2021.
- GRANATO, D.; NUNES, D. S.; BARBA, F. J. An integrated strategy between food chemistry, biology, nutrition, pharmacology, and statistics in the development of functional foods: A proposal. **Trends in Food Science and Technology**, v. 62, p. 13–22, 2017.
- GRIMOUD, J. *et al.* *In vitro* screening of probiotic lactic acid bacteria and prebiotic glucooligosaccharides to select effective synbiotics. **Anaerobe**, v. 16, n. 5, p. 493–500, 2010.
- GROM, L. C. *et al.* Probiotic dairy foods and postprandial glycemia: A mini-review. **Trends in Food Science and Technology**, v. 101, p. 165-171, 2020.
- GUEDES, J. DA S. *et al.* Protective effects of β -glucan extracted from spent brewer yeast during freeze-drying, storage and exposure to simulated gastrointestinal conditions of probiotic lactobacilli. **LWT**, v. 116, p. 1-9, 2019.
- GULEWICZ, P. *et al.* Simple method of isolation and purification of α -galactosides from legumes. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 48, n. 8, p. 3120–3123, 2000.
- GUO, S. *et al.* Co-fermented milk beverage has better stability and contains more health-promoting amino acid metabolites than single-strain-fermented milk beverage over one-month storage. **Food Chemistry**, v. 430, p. 1-11, 2024.
- HEINCKE, K. *et al.* Kinetics of the dextransucrase acceptor reaction with maltose- experimental results and modeling. **Enzyme and Microbial Technology**, n. 24, p. 523–534, 1999.
- HERRERA-ROCHA, K. M. *et al.* The Synergistic Effect of Quince Fruit and Probiotics (*Lactobacillus* and *Bifidobacterium*) on Reducing Oxidative Stress and Inflammation at the Intestinal Level and Improving Athletic Performance during Endurance Exercise. **Nutrients**, v. 15, n. 22, 2023.
- HESAM, F. *et al.* Valorization of sugarcane bagasse to high value-added xylooligosaccharides and evaluation of their prebiotic function in a synbiotic pomegranate juice. **Biomass Conversion and Biorefinery**, v. 13, p. 787–789, 2023.
- HILL, C. *et al.* Expert consensus document: The international scientific association for probiotics and prebiotics consensus statement on the scope and appropriate use of the term probiotic. **Nature Reviews Gastroenterology and Hepatology**, v. 11, n. 8, p. 506–514, 2014.

HOU, K. *et al.* Microbiota in health and diseases. **Signal Transduction and Targeted Therapy**, v. 7, n. 135, p. 1-28, 2022.

HU, L. *et al.* Gut microbiota-derived acetate attenuates lung injury induced by influenza infection via protecting airway tight junctions. **Journal of Translational Medicine**, v. 22, n. 1, 2024.

HU, W. *et al.* Effects of *in vitro* simulated digestion and fecal fermentation of polysaccharides from straw mushroom (*Volvariella volvacea*) on its physicochemical properties and human gut microbiota. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 239, p. 1-18, 2023.

JACOBS, J. P. *et al.* Multi-omics profiles of the intestinal microbiome in irritable bowel syndrome and its bowel habit subtypes. **Microbiome**, v. 11, n. 1, p. 1-18, 2023.

JIANG, Y. *et al.* Isolation of a novel characterized *Issatchenkia terricola* from red raspberry fruits on the degradation of citric acid and enrichment of flavonoid and volatile profiles in fermented red raspberry juice. **Food Science and Human Wellness**, v. 11, n. 4, p. 1018–1027, 2022.

KAEWARSAR, E. *et al.* Effects of Synbiotic Lacticaseibacillus paracasei, *Bifidobacterium breve*, and Prebiotics on the Growth Stimulation of Beneficial Gut Microbiota. **Foods**, v. 12, n. 20, p. 1-21, 2023.

KANG, G. *et al.* Predictive value of gut microbiota in long-term blood pressure control: a cross-sectional study. **European Journal of Medical Research**, v. 28, n. 115, p. 1-11, 2023.

KAPOOR, P. *et al.* Effect of anthocyanins on gut health markers, Firmicutes-Bacteroidetes ratio and short-chain fatty acids: a systematic review via meta-analysis. **Scientific Reports**, v. 13, n. 1729, p. 1-16, 2023.

KEBOUCHI, M. *et al.* Importance of digestive mucus and mucins for designing new functional food ingredients. **Food Research International**, v. 131, p. 1-10, 2020.

KIM, G. *et al.* Prebiotic activities of dextran from *Leuconostoc mesenteroides* SPCL742 analyzed in the aspect of the human gut microbial ecosystem. **Food and Function**, v. 13, n. 3, p. 1256–1267, 2022.

KIM, H. *et al.* Antioxidant and Probiotic Properties of Lactobacilli and Bifidobacteria of Human Origins. **Biotechnology and Bioprocess Engineering**, v. 25, n. 3, p. 421–430, 2020.

KOTHARI, D.; PATEL, S.; GOYAL, A. Therapeutic spectrum of nondigestible oligosaccharides: Overview of current state and prospect. **Journal of Food Science**, v. 79, n. 8, p. 1-8, 2014.

KOTHARI, D.; TINGIRIKARI, J. M. R.; GOYAL, A. *In vitro* analysis of dextran from *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B-1426 for functional food application. **Bioactive Carbohydrates and Dietary Fibre**, v. 6, n. 2, p. 55–61, 2015.

- LANGA, S. *et al.* Human Bifidobacterium strains as adjunct cultures in Spanish sheep milk cheese. **Journal of Dairy Science**, v. 103, n. 9, p. 7695–7706, 2020.
- LAVORATO, V. N. *et al.* Effects of aerobic exercise training and açai supplementation on cardiac structure and function in rats submitted to a high-fat diet. **Food Research International**, v. 141, p. 1-9, 2021.
- LEE, J. Anthocyanins of açai products in the United States. **NFS Journal**, v. 14–15, p. 14–21, 2019.
- LEITE, A. K. F. *et al.* Cashew apple juice containing gluco-oligosaccharides, dextran, and tagatose promotes probiotic microbial growth. **Food Bioscience**, v. 42, p. 1-11, 2021.
- LEITE, A. K. F. *et al.* Impact of orange juice containing potentially prebiotic ingredients on human gut microbiota composition and its metabolites. **Food Chemistry**, v. 405, p. 1-9, 2023.
- LI, H. *et al.* Development of a microencapsulated synbiotic product and its application in yoghurt. **LWT**, v. 122, p. 1-9, 2020.
- LI, H.; PORDESIMO, L.; WEISS, J. High intensity ultrasound-assisted extraction of oil from soybeans. **Food Research International**, v. 37, n. 7, p. 731–738, 2004.
- LI, X.-Y. *et al.* Regulation of gut microbiota by vitamin C, vitamin E and β -carotene. **Food Research International**, v. 169, p. 1-9, 2023.
- LINHARES, M. DE F. D. *et al.* Thermal and non-thermal processing effect on açai juice composition. **Food Research International**, v. 136, p. 1-12, 2020.
- LISBOA, C. R. *et al.* Compostos bioativos e potencial antioxidante de diferentes acessos de *Euterpe oleracea* e *Euterpe precatoria* do banco ativo de germoplasma de açai. **Research, Society and Development**, v. 11, n. 12, p. 1-12, 2022.
- LIU, W. *et al.* Development and validation of a new artificial gastric digestive system. **Food Research International**, v. 122, p. 183–190, 1 ago. 2019.
- LIU, Z. *et al.* A review of the interaction between diet composition and gut microbiota and its impact on associated disease. **Journal of Future Foods**, v. 122, p. 183–190, 2024.
- LO CURTO, A. *et al.* Survival of probiotic lactobacilli in the upper gastrointestinal tract using an *in vitro* gastric model of digestion. **Food Microbiology**, v. 28, n. 7, p. 1359–1366, 2011.
- LOBO, A. C. M.; VELASQUE, L. F. L. Revisão de literatura sobre os efeitos terapêuticos do açai e sua importância na alimentação. **Biosaúde**, v. 18, p. 97–106, 2016.
- LU, Y. *et al.* Microbiota-derived short-chain fatty acids: Implications for cardiovascular and metabolic disease. **Frontiers in Cardiovascular Medicine**, v. 9, p. 1–17, 2022.

- LUCIANO, W. A. *et al.* Effects of *Lactobacillus acidophilus* LA-3 on physicochemical and sensory parameters of açai and mango based smoothies and its survival following simulated gastrointestinal conditions. **Food Research International**, v. 114, n. March, p. 159–168, 2018.
- MAQSOOD, S. *et al.* Bioactive compounds from date fruit and seed as potential nutraceutical and functional food ingredients. **Food Chemistry**, v. 308, p. 1-18, 2020.
- MARCHESI, J. R. *et al.* The gut microbiota and host health: A new clinical frontier. **Gut**, v. 65, n. 2, p. 330–339, 2016.
- MARGRAF, T. *et al.* Comparison between Folin-Ciocalteu and Prussian Blue Assays to Estimate The Total Phenolic Content of Juices and Teas Using 96-Well Microplates. **Journal of Food Science**, v. 80, n. 11, p. 1-7, 2015.
- MARKOWIAK-KOPEĆ, P.; ŚLIŻEWSKA, K. The effect of probiotics on the production of short-chain fatty acids by human intestinal microbiome. **Nutrients**, v. 12, n. 4, p. 1-23, 2020.
- MARTINEZ, R. C. R. *et al.* *In vitro* evaluation of gastrointestinal survival of *Lactobacillus amylovorus* DSM 16698 alone and combined with galactooligosaccharides, milk and/or *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* Bb-12. **International Journal of Food Microbiology**, v. 149, n. 2, p. 152–158, 2011.
- MARTINS, I. C. V. S. *et al.* The value of the Brazilian açai fruit as a therapeutic nutritional strategy for chronic kidney disease patients. **International Urology and Nephrology**, v. 50, p. 2207–2220, 2018.
- MINEKUS, M. *et al.* A standardised static *in vitro* digestion method suitable for food-an international consensus. **Food and Function**, v. 5, n. 6, p. 1113–1124, 2014.
- MIRANDA, R. F. *et al.* Impact of the addition of *Lactobacillus casei* and oligofructose on the quality parameters of orange juice and hibiscus tea mixed beverage. **Journal of Food Processing and Preservation**, v. 43, n. 12, p. 1-11, 2019.
- MOENS, F.; VERCE, M.; DE VUYST, L. Lactate- and acetate-based cross-feeding interactions between selected strains of lactobacilli, bifidobacteria and colon bacteria in the presence of inulin-type fructans. **International Journal of Food Microbiology**, v. 241, p. 225–236, 2017.
- MOHAJERI, M. H. *et al.* The role of the microbiome for human health: from basic science to clinical applications. **European Journal of Nutrition**, v. 57, p. 1–14, 2018.
- MOOSAVI, M. H. *et al.* A review of recent advances in the decontamination of mycotoxin and inactivation of fungi by ultrasound. **Ultrasonics Sonochemistry**, v. 79, p. 1–6, 2021.
- MOREIRA, R. M. *et al.* Development of a juçara and Ubá mango juice mixture with added *Lactobacillus rhamnosus* GG processed by high pressure. **LWT**, v. 77, p. 259–268, 2017.

MOUSSAVI, M. *et al.* Viability and *In Vitro* Gastrointestinal Transit Tolerance of Multispecies Probiotic Combinations Incorporated into Orange Juice and Drinking Water. **Foods**, v. 12, n. 11, p. 1-15, 2023.

NAKAMURA, S. *et al.* Bacteroidota polysaccharide utilization system for branched dextran exopolysaccharides from lactic acid bacteria. **Journal of Biological Chemistry**, v. 299, n. 7, p. 1-15, 2023.

NASCIMENTO, A. L. A. A. *et al.* Influence of spontaneous and inoculated fermentation of açai on simulated digestion, antioxidant capacity and cytotoxic activity. **Food Research International**, v. 173, p. 1-10, 2023.

NASCIMENTO, C. S. DO; SANTOS, B. N.; RODRIGUES, S. High-intensity ultrasound processed acerola juice containing oligosaccharides and dextran promotes *Lactocaseibacillus casei* NRRL B-442 growth. **International Journal of Food Science and Technology**, p. 1–9, 2022.

NASERI, K. *et al.* Evaluation of gut microbiota of iranian patients with celiac disease, non-celiac wheat sensitivity, and irritable bowel syndrome: are there any similarities? **BMC Gastroenterology**, v. 23, n. 1, p. 1-10, 2023.

NDA. Scientific Opinion on Dietary Reference Values for carbohydrates and dietary fibre. **EFSA Journal**, v. 8, n. 3, p. 1-10, 2010.

NISHIDA, C. *et al.* The Joint WHO/FAO Expert Consultation on diet, nutrition and the prevention of chronic diseases: process, product and policy implications. **Public Health Nutrition**, v. 7, n. 1, p. 245–250, 2004.

NOGUEIRA, O. L. **Açaí**. 4. ed. Belém, PA: Embrapa Amazônia Oriental, 2005.

PACHECO-PALENCIA, L. A.; DUNCAN, C. E.; TALCOTT, S. T. Phytochemical composition and thermal stability of two commercial açai species, *Euterpe oleracea* and *Euterpe precatoria*. **Food Chemistry**, v. 115, n. 4, p. 1199–1205, 2009.

PALMNÄS-BEDARD, M. S. A. *et al.* The human gut microbiota and glucose metabolism: a scoping review of key bacteria and the potential role of SCFAs. **American Journal of Clinical Nutrition**, v. 116, n. 4, p. 862–874, 2022.

PAN, L.; HAN, Y.; ZHOU, Z. *In vitro* prebiotic activities of exopolysaccharide from *Leuconostoc pseudomesenteroides* XG5 and its effect on the gut microbiota of mice. **Journal of Functional Foods**, v. 67, p. 1–8, 2020.

PARHI, P.; SONG, K. P.; CHOO, W. S. Effect of prebiotic supplementation on the low-temperature storage stability and *in vitro* gastrointestinal tolerance of *Bifidobacterium breve* and *Bifidobacterium longum* in lactose and sucrose systems. **Bioactive Carbohydrates and Dietary Fibre**, v. 30, p. 1-8, 2023.

- PENG, W. *et al.* Effect of the apple cultivar on cloudy apple juice fermented by a mixture of *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus plantarum*, and *Lactobacillus fermentum*. **Food Chemistry**, v. 340, p. 127922, 2021.
- PEREDO-LOVILLO, A.; ROMERO-LUNA, H. E.; JIMÉNEZ-FERNÁNDEZ, M. Health promoting microbial metabolites produced by gut microbiota after prebiotics metabolism. **Food Research International**, v. 136, p. 1-13, 2020.
- PEREIRA, A. L. F. *et al.* Storage Stability and Acceptance of Probiotic Beverage from Cashew Apple Juice. **Food and Bioprocess Technology**, v. 6, n. 11, p. 3155–3165, 2013.
- PEREIRA, A. L. F. *et al.* Impact of fermentation conditions on the quality and sensory properties of a probiotic cupuassu (*Theobroma grandiflorum*) beverage. **Food Research International**, v. 100, p. 603–611, 2017.
- PEREIRA, A. P. DE A. *et al.* Land degradation affects the microbial communities in the Brazilian Caatinga biome. **Catena**, v. 211, p. 1–9, 2022.
- PERRI, M. R. *et al.* Beneficial role of fruits, their juices, and freeze-dried powders on inflammatory bowel disease and related dysbiosis. **Plants**, v. 11, n. 4, p. 1-23, 2022.
- PERRICONE, M. *et al.* Challenges for the production of probiotic fruit juices. **Beverages**, v. 1, n. 2, p. 95-103, 2015.
- PERRIN, S. *et al.* Fermentations of fructo-oligosaccharides and their components by *Bifidobacterium infantis* ATCC 15697 on batch culture in semi-synthetic medium. **Journal of Applied Microbiology**, v. 90, n. 6, p. 859–865, 2001.
- PHAM, V. T. *et al.* Vitamins, the gut microbiome and gastrointestinal health in humans. **Nutrition Research**, v. 95, p. 35-53, 2021.
- PIRES, C. V. *et al.* Qualidade nutricional e escore químico de aminoácidos de diferentes fontes proteicas. **Ciênc. Tecnol. Aliment.**, v. 26, n. 1, p. 179–187, 2006.
- PONTES, V. C. B. *et al.* Increased acute blood flow induced by the aqueous extract of *Euterpe oleracea* Mart. fruit pulp in rats *in vivo* is not related to the direct activation of endothelial cells. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 271, p. 1-11, 2021.
- RABELO, M. C.; FONTES, C. P. M. L.; RODRIGUES, S. Enzyme synthesis of oligosaccharides using cashew apple juice as substrate. **Bioresource Technology**, v. 100, n. 23, p. 5574–5580, 2009.
- RAJAM, R.; SUBRAMANIAN, P. Encapsulation of probiotics: past, present and future. **Beni-Suef University Journal of Basic and Applied Sciences**, v. 11, n. 46, p. 2–18, 2022.
- RATHNAKUMAR, K. *et al.* Applications of ultrasonication on food enzyme inactivation-recent review report (2017–2022). **Ultrasonics Sonochemistry**, v. 96, p. 1-16, 2023.

RAWI, M. H. *et al.* Prebiotics metabolism by gut-isolated probiotics. **Journal of Food Science and Technology**, v. 57, n. 8, p. 2786–2799, 2020.

REGINIO, F. C. *et al.* Bio-properties of Saba banana (*Musa* ‘saba’, ABB Group): Influence of maturity and changes during simulated *in vitro* gastrointestinal digestion. **Scientific Reports**, v. 10, n. 1, p. 1-11, 2020.

RIBEIRO, A. P. DE O. *et al.* Development of a probiotic non-fermented blend beverage with juçara fruit: Effect of the matrix on probiotic viability and survival to the gastrointestinal tract. **LWT**, v. 118, p. 1-7, 2020.

RIVERA-PIZA, A.; LEE, S. J. Effects of dietary fibers and prebiotics in adiposity regulation via modulation of gut microbiota. **Applied Biological Chemistry**, v. 63, n. 2, p. 1-12, 2020.

RODRIGUES, S.; LONA, L. M. F.; FRANCO, T. T. The effect of maltose on dextran yield and molecular weight distribution. **Bioprocess and Biosystems Engineering**, v. 28, n. 1, p. 9–14, 2005.

RODRIGUES, V. C. DA C. *et al.* Modulation of the intestinal microbiota and the metabolites produced by the administration of ice cream and a dietary supplement containing the same probiotics. **British Journal of Nutrition**, v. 124, n. 1, p. 57–68, 2020.

RUFINO, M. DO S. M. *et al.* Açai (*Euterpe oleraceae*) “BRS Pará”: A tropical fruit source of antioxidant dietary fiber and high antioxidant capacity oil. **Food Research International**, v. 44, n. 7, p. 2100–2106, 2011.

RYUK, J. A. *et al.* Protection against Neurological Symptoms by Consuming Corn Silk Water Extract in Artery-Occluded Gerbils with Reducing Oxidative Stress, Inflammation, and Post-Stroke Hyperglycemia through the Gut-Brain Axis. **Antioxidants**, v. 11, n. 168, p. 1-20, 2022.

SAARELA, M. *et al.* Stability and functionality of freeze-dried probiotic *Bifidobacterium* cells during storage in juice and milk. **International Dairy Journal**, v. 16, n. 12, p. 1477–1482, 2006.

SANÍN, A.; NAVIA, D. P.; SERNA-JIMÉNEZ, J. A. Functional Foods from Crops on the Northern Region of the South American Andes: The Importance of Blackberry, Yacon, Açai, Yellow Pitahaya and the Application of Its Biocompounds. **International Journal of Fruit Science**, v. 20, n. 3, p. 1784–1804, 2020.

SANTOS FILHO, A. L. DOS *et al.* Production and stability of probiotic cocoa juice with sucralose as sugar substitute during refrigerated storage. **LWT**, v. 99, p. 371–378, 2019.

SANTOS, R. O. *et al.* Prebiotic flours in dairy food processing: Technological and sensory implications. **International Journal of Dairy Technology**, v. 71, p. 1–10, 2018.

SARACINO, I. M. *et al.* Antimicrobial efficacy of five probiotic strains against *Helicobacter pylori*. **Antibiotics**, v. 9, n. 5, p. 1-10, 2020.

SCHERER, R.; RYBKA, A. C. P.; GODOY, H. T. Determinação simultânea dos ácidos orgânicos tartárico, málico, ascórbico e cítrico em polpas de acerola, açaí e caju e avaliação da estabilidade em sucos de caju. **Química Nova**, v. 31, n. 5, p. 1137–1140, 2008.

SENUKHOVA, M. A. Microbiota of the gastrointestinal tract: Friend or foe? **World Journal of Gastroenterology**, v. 29, n. 1, p. 19-42, 2023.

SENSOY, I. A review on the food digestion in the digestive tract and the used *in vitro* models. **Current Research in Food Science**, v. 4, p. 308–319, 2021.

SHANNON, C. E. A Mathematical Theory of Communication. **The Bell System Technical Journal**, v. 27, n. 3, p. 379–423, 1948.

SHI, E. *et al.* Polysaccharides affect the utilization of β -carotene through gut microbiota investigated by *in vitro* and *in vivo* experiments. **Food Research International**, v. 174, p. 1-13, 2023.

SHI, Y. *et al.* *In vitro* digestibility and prebiotic potential of curdlan (1 \rightarrow 3)- β -D-glucan oligosaccharides in *Lactobacillus* species. **Carbohydrate Polymers**, v. 188, p. 17–26, 2018.

SILVA, R. M.; CAMPELO, P. H.; RODRIGUES, S. *In vitro* viability of *L. Casei* B-442 and fructooligosaccharides integrity in Amazonian sapota-do-solimões functional juice. **Food Research International**, v. 154, p. 1-8, 2022.

SILVEIRA, V. N. *et al.* Determination of Ascorbic Acid in Long Life Juices by Cyclic Voltammetry Using External Standards and Standard Addition Methods: An Experimental Proposal for Teaching Analytical Instrumental Chemistry. **Revista Virtual de Química**, v. 14, n. 5, p. 927–936, 2022.

SOARES, M. B. *et al.* The resistance of *Bacillus*, *Bifidobacterium*, and *Lactobacillus* strains with claimed probiotic properties in different food matrices exposed to simulated gastrointestinal tract conditions. **Food Research International**, v. 125, p. 1-11, 2019.

SONG, H. *et al.* Dietary anthocyanin-rich extract of açaí protects from diet-induced obesity, liver steatosis, and insulin resistance with modulation of gut microbiota in mice. **Nutrition**, v. 86, p. 1-8, 2021.

SOUZA, M. O. *et al.* A prospective study in women: açaí (*Euterpe oleracea* Martius) dietary intake affects serum p-selectin, leptin, and visfatin levels. **Nutr Hosp.**, v. 38, n. 1, p. 121–127, 2021.

STEPHEN, A. M. *et al.* Dietary fibre in Europe: Current state of knowledge on definitions, sources, recommendations, intakes and relationships to health. **Nutr Res Rev.**, v. 30, n. 2, p. 149-190, 2017.

SWANSON, K. S. *et al.* The International Scientific Association for Probiotics and Prebiotics (ISAPP) consensus statement on the definition and scope of synbiotics. **Nature Reviews Gastroenterology and Hepatology**, v. 17, n. 11, p. 687–701, 2020.

TALEBI, S. *et al.* The effects of synbiotic supplementation on thyroid function and inflammation in hypothyroid patients: A randomized, double-blind, placebo-controlled trial. **Complementary Therapies in Medicine**, v. 48, p. 1-6, 2020.

TANASE, D. M. *et al.* Role of gut microbiota on onset and progression of microvascular complications of type 2 diabetes (T2DM). **Nutrients**, v. 48, p. 1-26, 2020.

TANRISEVEN, A.; DOGAN, S. Production of isomalto-oligosaccharides using dextransucrase immobilized in alginate fibres. **Process Biochemistry**, v. 37, n. 10, p. 1111-1115, 2002.

TAVARES, G. DOS S. *et al.* Análise Da Produção E Comercialização De Açaí No Estado Do Pará, Brasil. **International Journal of Development Research**, v. 10, n. 4, p. 35215–35221, 2020.

TERRAZAS, S. I. B. M. *et al.* Açai pulp supplementation as a nutritional strategy to prevent oxidative damage, improve oxidative status, and modulate blood lactate of male cyclists. **European Journal of Nutrition**, v. 59, n. 7, p. 2985–2995, 2020.

TUNCIL, Y. E. *et al.* Reciprocal prioritization to dietary glycans by gut bacteria in a competitive environment promotes stable coexistence. **mBio**, v. 8, n. 5, p. 1–17, 2017.

VALERO-CASES, E. *et al.* Non-dairy fermented beverages as potential carriers to ensure probiotics, prebiotics, and bioactive compounds arrival to the gut and their health benefits. **Nutrients**, v. 12, n. 6, p. 2–18, 2020.

VANDAMME, E. J.; SOETAERT, W. Biotechnical modification of carbohydrates. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 16, n. 2–3, p. 163–186, 1995.

VERGARA, C. M. DE A. C. *et al.* Prebiotic effect of fermented cashew apple (*Anacardium occidentale* L.) juice. **LWT**, v. 43, n. 1, p. 141–145, 2010.

WALSH, L. H. *et al.* Comparison of the relative impacts of acute consumption of an inulin-enriched diet, milk kefir or a commercial probiotic product on the human gut microbiome and metabolome. **npj Science of Food**, v. 7, n. 1, p. 1-18, 2023.

WEI, X. *et al.* Dietary galactosyl and mannosyl carbohydrates: *In-vitro* assessment of prebiotic effects. **Food Chemistry**, v. 329, p. 1-12, 2020.

WEN, J. *et al.* Effects of probiotic litchi juice on immunomodulatory function and gut microbiota in mice. **Food Research International**, v. 137, p. 1-9, 2020.

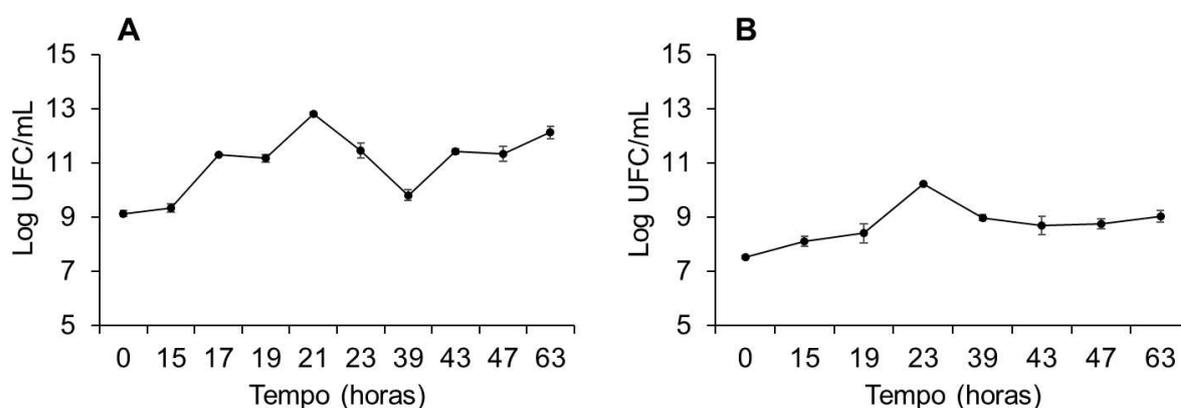
WENDEL, U. Assessing Viability and Stress Tolerance of Probiotics—A Review. **Frontiers in Microbiology**, v. 12, p. 1-16, 2022.

- XAVIER-SANTOS, D. *et al.* Impact of probiotics and prebiotics targeting metabolic syndrome. **Journal of Functional Foods**, v. 64, p. 1-17, 2020.
- XIE, X. *et al.* Characterization of sea buckthorn polysaccharides and the analysis of its regulatory effect on the gut microbiota imbalance induced by cefixime in mice. **Journal of Functional Foods**, v. 104, p. 1-11, 2023.
- YOON, K. Y.; WOODAMS, E. E.; HANG, Y. D. Probiotication of tomato juice by lactic acid bacteria. **Journal of Microbiology**, v. 42, n. 4, p. 315–318, 2004.
- ZAFAR, H.; SAIER, M. H. Gut Bacteroides species in health and disease. **Gut Microbes**, v. 13, n. 1, p. 1-20, 2021.
- ZENG, M.; VAN PIJKEREN, J. P.; PAN, X. Gluco-oligosaccharides as potential prebiotics: Synthesis, purification, structural characterization, and evaluation of prebiotic effect. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, v. 22, p. 2611–2651, 2023.
- ZHANG, L. *et al.* Release of bound polyphenols from wheat bran soluble dietary fiber during simulated gastrointestinal digestion and colonic fermentation *in vitro*. **Food Chemistry**, v. 402, p. 1-9, 2023a.
- ZHANG, M. *et al.* Application progress of ultrasonication in flour product processing: A review. **Ultrasonics Sonochemistry**, v. 99, p. 1-10, 2023b.
- ZHANG, N. *et al.* A Novel *Bifidobacterium/Klebsiella* Ratio in Characterization Analysis of the Gut and Bile Microbiota of CCA Patients. **Microbial Ecology**, v. 87, n. 1, p. 1-15, 2024.
- ZHAO, C. *et al.* Discovery of potential genes contributing to the biosynthesis of short-chain fatty acids and lactate in gut microbiota from systematic investigation in *E. coli*. **npj Biofilms and Microbiomes**, v. 5, n. 1, p. 1-8, 2019.
- ZHU, Y. *et al.* Effects of exopolysaccharide from *Lactobacillus rhamnosus* on human gut microbiota in *in vitro* fermentation model. **LWT**, v. 139, p. 1–9, 2021.

APÊNDICE A - RESISTÊNCIA DE *Lacticaseibacillus casei* EM SUCO AÇAÍ PREBIÓTICO APÓS A DIGESTÃO SIMULADA *IN VITRO*

Os resultados preliminares da viabilidade celular no crescimento semi-dinâmico e estático de *Lacticaseibacillus casei* inoculado no suco de açaí prebiótico após a digestão simulada *in vitro* estão apresentados na Figura 30.

Figura 30 - Crescimento semi-dinâmico (A) e estático (B) de *Lacticaseibacillus casei* em suco de açaí prebiótico durante a fermentação após a digestão simulada *in vitro*.



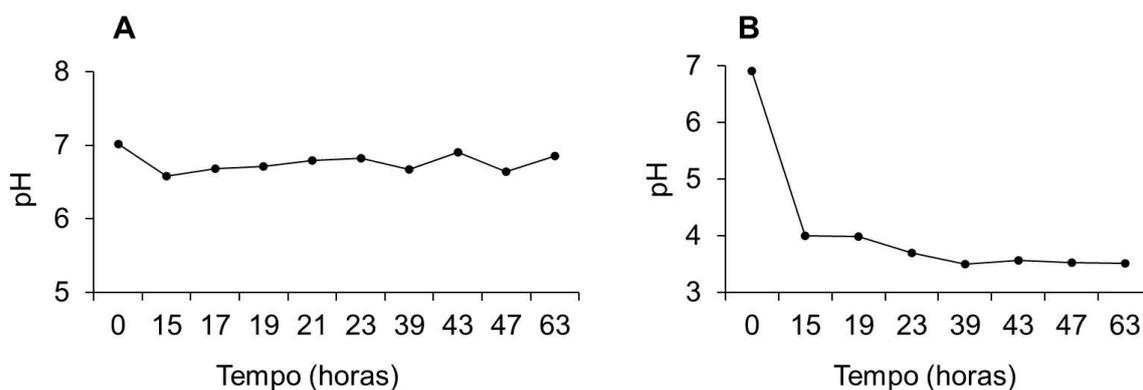
Fonte: Elaborada pela autora.

O crescimento semi-dinâmico de *Lacticaseibacillus casei* (Figura 30A) alcançou contagem máxima de $12,81 \pm 0,05$ Log UFC/mL em 21 h de fermentação, com aumento de aproximadamente 3,6 Log UFC/mL. Após esse período houve redução nas contagens e posterior aumento a partir das 39 h de fermentação. Durante a fermentação estática, observa-se pouco crescimento do probiótico estudado. Tendo em vista que nesse modelo de fermentação não há controle de pH, apenas de temperatura, é possível que o pH inferior a 4,0 após 15 h de fermentação tenha proporcionado uma condição desfavorável ao crescimento do *Lacticaseibacillus casei*. A redução da viabilidade celular de probióticos pode ser atribuída ao decréscimo do pH no meio e ao acúmulo de ácidos orgânicos resultantes do seu metabolismo de fermentação (YOON; WOODAMS; HANG, 2004).

No crescimento semi-dinâmico, a fermentação possui controle de temperatura, assim como o estático, e ainda controle de pH, apresentando pouca variação. Porém, cabe

ressaltar que durante essa fermentação houve dosagem de NaOH 3M pelo controlador para manter o pH em 7,0, indicando que o meio estava acidificando (Figura 31).

Figura 31 - pH do crescimento semi-dinâmico e estático de *Lacticaseibacillus casei* em suco de açaí prebiótico durante a fermentação após a digestão simulada *in vitro*.



Fonte: Elaborada pela autora.

O pH no crescimento estático diminuiu consideravelmente nas primeiras 15 h de fermentação, indicando a possibilidade de maior atividade metabólica do microrganismo nesse período (Figura 31B). Dessa forma, é importante analisar a quantidade de ácido lático produzida para confirmar que seu metabolismo estava em atividade intensa.

**APÊNDICE B – TEMPO DE ATIVAÇÃO E REPIQUE DE *Bifidobacterium breve*
NRRL B-41408**

Foram realizados testes de viabilidade de *Bifidobacterium breve* NRRL B-41408 no meio de cultura bifidobacterium a fim de reduzir o tempo de elaboração do suco funcional. Dessa forma, a cepa foi ativada em incubadora shaker com agitação (Solab®) durante 18 e 24h e repicada no shaker e na incubadora BOD após 24h. Verificou-se que o tempo de ativação de 18 h foi suficiente para manter as células do microrganismo viáveis, sem a necessidade de prolongar a ativação ou fazer o repique, conforme a Tabela 2.

Tabela 2 - Teste de viabilidade de *Bifidobacterium breve* NRRL B-41408 no meio bifidobacterium.

Tempo (h)	Viabilidade de <i>Bifidobacterium breve</i> NRRL B-41408		
	Ativação shaker	Repique shaker	Repique BOD
18	10,49 log UFC/mL	-	-
24	9,72 log UFC/mL	8,52 log UFC/mL	7,21 log UFC/mL

Fonte: elaborada pela autora.

APÊNDICE C - SUCO DE AÇAÍ CONTENDO GLICO-OLIGOSSACARÍDEOS E DEXTRANA SONICADO FERMENTADO COM *Bifidobacterium breve* NRRL B-41408

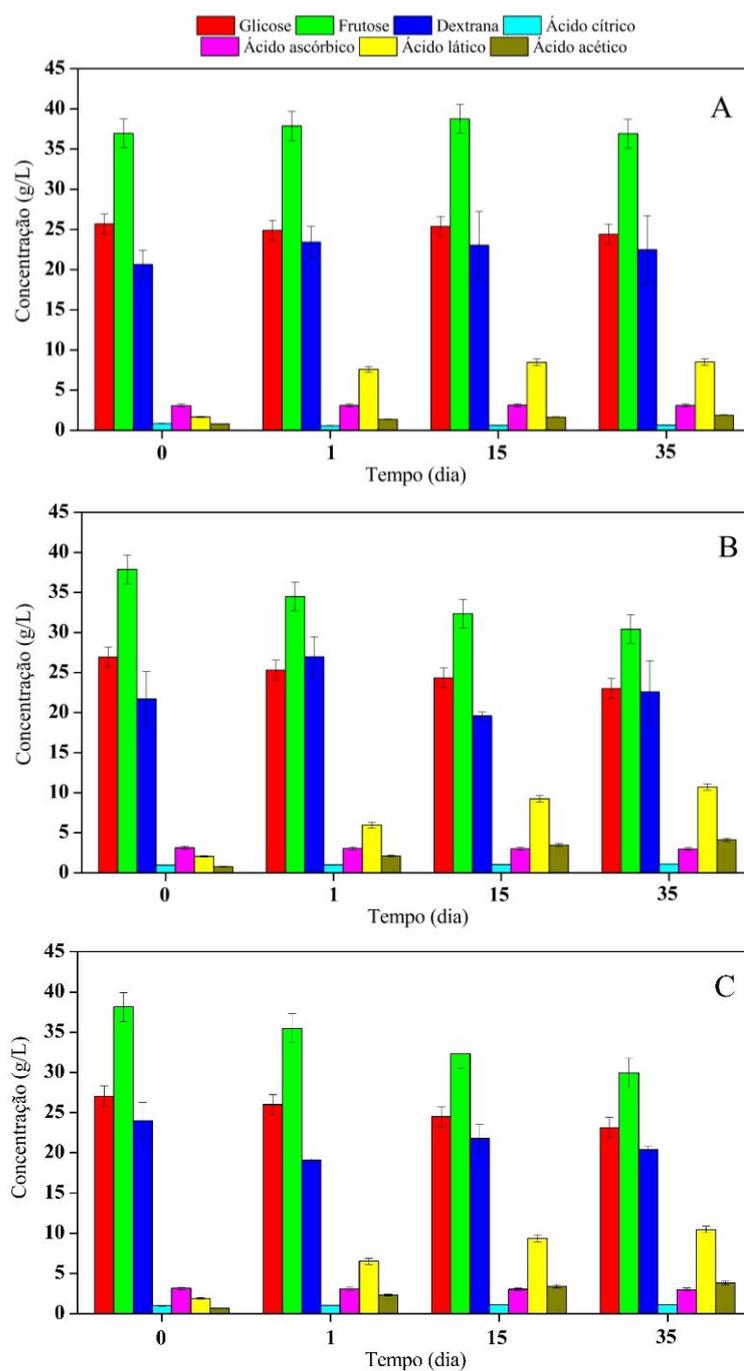
O suco de açaí contendo glico-oligossacarídeos e dextrana foi processado por ultrassom de alta intensidade durante 3, 6 e 9 min e posteriormente fermentado com *Bifidobacterium breve* NRRL B-41408. O dia 0 significa o suco prebiótico sonicado e o dia 1, o suco após a fermentação com a cepa probiótica. Observou-se comportamento semelhante nos sucos sonicados por 6 e 9 min quanto ao consumo de glicose e frutose e a produção de ácidos láctico e acético (Figura 32).

A viabilidade de *Bifidobacterium breve* NRRL B-41408 após a fermentação foi superior no suco sonicado por 9 min, no entanto a viabilidade reduz após 35 dias em comparação aos demais tempos de processamento. Os sucos sonicados por 6 e 9 min possuem comportamentos semelhantes. Ao final do armazenamento todos os sucos apresentam viabilidade de *B. breve* acima de 7,0 log UFC/mL (Figura 33).

De maneira geral, o efeito do tempo de processamento no suco de açaí foi sutil e a escolha do melhor tempo se deu em função da pesquisa na literatura em artigos. Estudos mostram 10 min de processamento por ultrassom melhoram a estabilidade de prebióticos após a digestão simulada *in vitro* em suco de acerola (NASCIMENTO; SANTOS; RODRIGUES, 2022) e sucos de caju sonicados por 8 min com maiores intensidades de potência apresentaram maior capacidade antioxidante (ABTS, FRAP e DPPH), relacionados com maior teor de compostos fenólicos totais e flavonóides amarelos (FONTELES et al., 2021).

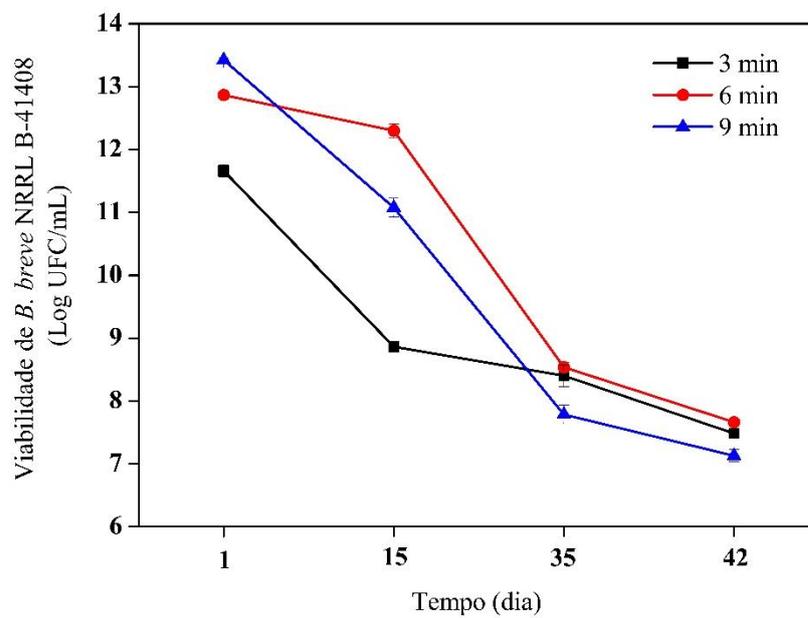
Todavia, os sucos contendo glico-oligossacarídeos e dextrana processados por ultrassom não foram fermentados por *B. breve*, pois inicialmente o objetivo do trabalho foi verificar se o suco de açaí sonicado apresentava algum impacto na microbiota intestinal humana. Além disso, os resultados do processamento do suco na viabilidade de *B. breve* também foram semelhantes, havendo perda da viabilidade no decorrer do armazenamento refrigerado. Portanto, a pesquisa realizada com o suco de açaí potencialmente simbiótico não englobou o processamento.

Figura 32 – Concentração de carboidratos e ácidos no suco de açaí potencialmente simbiótico sonificado por 3 min (A), 6 min (B) e 9 min (C) durante o armazenamento a 4 °C.



Fonte: elaborada pela autora.

Figura 33 - Viabilidade de *B. breve* NRRL B-41408 em suco de açaí potencialmente simbiótico sonicado por 3, 6 e 9 min durante o armazenamento a 4 °C.



Fonte: elaborada pela autora.

APÊNDICE D – MODELO DO TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Os projetos aprovados pelo CEP foram: “Impacto do processamento de alimentos na microbiota humana” e “Efeito do processamento de sucos de frutas funcionais na composição e bioatividade da microbiota intestinal”.

Você está sendo convidado como participante da pesquisa. Você não deve participar contra a sua vontade. Leia atentamente as informações abaixo e faça qualquer pergunta que desejar, para que todos os procedimentos desta pesquisa sejam esclarecidos.

A presente pesquisa envolve o uso de fezes humanas para o estudo dos efeitos de diferentes processamentos e nutrientes na composição da microbiota intestinal. O participante será convidado a realizar a coleta das fezes de forma higiênica em local reservado e em recipiente apropriado para a coleta desse tipo de material. O material coletado será utilizado em ensaios de fermentação e em seguida as amostras serão submetidas a identificação dos microorganismos presentes através de métodos adequados. Os pesquisadores se comprometem em utilizar os dados e/ou material coletado somente para esta pesquisa.

Os doadores não receberão **NENHUM PAGAMENTO POR PARTICIPAR DA PESQUISA.**

A qualquer momento o participante poderá recusar a continuar participando da pesquisa e também poderá retirar o seu consentimento, sem que isso lhe traga qualquer prejuízo.

As informações conseguidas através da sua participação não permitirão a identificação da sua pessoa, exceto aos responsáveis pela pesquisa, e a divulgação das mencionadas informações só será feita entre os profissionais estudiosos do assunto.

Endereço da responsável pela pesquisa:

Nome: Thatyane Vidal Fonteles

Instituição: Universidade Federal do Ceará

Endereço: Av. Mister Hull, s/n, Campus do Pici, Bloco 851, Dept. de Engenharia de Alimentos,
Laboratório de Biotecnologia

Telefones para contato: -----

ATENÇÃO: Se você tiver alguma consideração ou dúvida, sobre a sua participação na pesquisa, entre em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa da UFC/PROPESQ – Rua Coronel Nunes de Melo, 1000 - Rodolfo Teófilo, fone: 3366-8344/46. (Horário: 08:00-12:00 horas de segunda a sexta-feira).

O CEP/UFC/PROPESQ é a instância da Universidade Federal do Ceará responsável pela avaliação e acompanhamento dos aspectos éticos de todas as pesquisas envolvendo seres humanos.

O abaixo assinado _____, ____anos,
RG: _____, declara que é de livre e espontânea vontade que está como participante de uma pesquisa. Eu declaro que li cuidadosamente este Termo de Consentimento Livre e Esclarecido e que, após sua leitura, tive a oportunidade de fazer perguntas sobre o seu conteúdo, como também sobre a pesquisa, e recebi explicações que responderam por completo minhas dúvidas. E declaro, ainda, estar recebendo uma via assinada deste termo.

Fortaleza, ____/____/____

Nome do participante da pesquisa	Data	Assinatura
Nome do pesquisador Thatyane Vidal Fonteles	Data	Assinatura
Nome do profissional Thatyane Vidal Fonteles que aplicou o TCLE	Data	Assinatura