



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

**CRISTIANO SILVA DO NASCIMENTO**

**EFEITO PREBIÓTICO DO SUCO DE ACEROLA CONTENDO GLICO-  
OLIGOSSACARÍDEOS E DEXTRANA PROCESSADO POR ULTRASSOM NO  
CRESCIMENTO DO PROBIÓTICO *Lactocaseibacillus casei* NRRL B-442**

**FORTALEZA**

**2021**

CRISTIANO SILVA DO NASCIMENTO

EFEITO PREBIÓTICO DO SUCO DE ACEROLA CONTENDO GLICO-  
OLIGOSSACARÍDEOS E DEXTRANA PROCESSADO POR ULTRASSOM NO  
CRESCIMENTO DO PROBIÓTICO *Lactocaseibacillus casei* NRRL B-442

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre. Área de concentração: Ciência e Tecnologia de Alimentos.

Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Sueli Rodrigues

FORTALEZA

2021

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação  
Universidade Federal do Ceará  
Biblioteca Universitária

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

---

N194e Nascimento, Cristiano Silva do.

Efeito prebiótico do suco de acerola contendo glico-oligossacarídeos e dextrana processado por ultrassom no crescimento do probiótico *Lactocaseibacillus casei* NRRL B-442 / Cristiano Silva do Nascimento. – 2021.

58 f. : il. color.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal do Ceará, Centro de Ciências Agrárias, Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, Fortaleza, 2021.

Orientação: Profa. Dra. Sueli Rodrigues.

1. ultrassom de alta intensidade. 2. glico-oligossacarídeos. 3. dextrana. 4. *Lactocaseibacillus casei*. I. Título.

CDD 664

---

CRISTIANO SILVA DO NASCIMENTO

EFEITO PREBIÓTICO DO SUCO DE ACEROLA CONTENDO GLICO-  
OLIGOSSACARÍDEOS E DEXTRANA PROCESSADO POR ULTRASSOM NO  
CRESCIMENTO DO PROBIÓTICO *Lactocaseibacillus casei* NRRL B-442

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre. Área de concentração: Ciência e Tecnologia de Alimentos.

Aprovada em: 06/10/2021.

BANCA EXAMINADORA

---

Prof. Dra. Sueli Rodrigues (Orientadora)  
Universidade Federal do Ceará (UFC)

---

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

---

Prof<sup>a</sup>. Dra. Marciane Magnani  
Universidade Federal da Paraíba (UFPA)

À minha mãe,

Pois tudo que sou devo a você.

*(in Memoriam)*

## **AGRADECIMENTOS**

À minha amada mãe, por sempre acreditar em mim e por tornar esse sonho possível. Tudo que sou devo a você, e nos meus atos, palavras e pensamentos, sua memória está viva. Todos os dias penso em você, com saudade e amor.

À minha tia Luciana, por ser um exemplo de dedicação e esforço.

À minha família, por todo amor e carinho.

À professora Sueli Rodrigues, pela orientação, dedicação, paciência e por sempre está à disposição para ajudar na minha caminhada científica.

Aos membros participantes da banca examinadora, Dra. Thatyane Vidal Fonteles e Dra. Marciane Magnani pelo tempo, pelas valiosas colaborações e sugestões.

À equipe do Labiotec, a Rhony, o Rony, Day, Karol, Alana, Brenda e Andressa. Obrigado por todos os momentos de descontração, risadas, pelo apoio, conselhos, amizade e ajuda nos momentos de total desespero. Agradeço também aos professores Elenilson e Ítalo.

Agradecimento especial a minha companheira de enzima, Brenda. Sem sua dedicação em ajudar na produção da enzima, meu trabalho estaria estacionado até hoje rs.

À Rhony, por todo o companheirismo durante o mestrado, pelas risadas, memes e por sofrer junto comigo.

Aos meus melhores amigos desde o ensino médio, Sombra, Kamelly, Alice, Sanara e Jamelly pela amizade e por sempre estarem ao meu lado.

O presente trabalho foi realizado com o apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento do Pessoal de Nível Superior (CAPES) - Código de financiamento 001. Agradeço ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), a Fundação Cearense de Apoio ao Desenvolvimento Científico e Tecnológico (FUNCAP) e ao Instituto Nacional de Frutos Tropicais (INCT-FT) pelo apoio financeiro.

Agradeço também a Universidade Federal do Ceará pela formação durante esses anos.

“Sucesso significa realizar seus próprios sonhos, cantar sua própria canção, dançar sua própria dança, criar do seu coração e apreciar a jornada.”

Elana Lindquist.

## RESUMO

Diante dos diversos benefícios à saúde que o consumo regular de alimentos funcionais proporciona, a demanda por alimentos prebióticos vem crescendo nos últimos anos e com ela, as pesquisas envolvendo este produto. O presente estudo obteve sucos de acerola prebióticos sintetizando glico-oligossacarídeos e dextrana diretamente no suco usando glicose, frutose e sacarose como substrato. A síntese de glico-oligossacarídeos e dextrana foi realizada pela enzima dextrana-sacarase (30 °C/ 6 h/100 rpm). Os sucos prebióticos foram processados por ultrassom de alta intensidade (500 W, 2 min, 6 min e 10 min) para avaliar seus efeitos no metabolismo do probiótico. Foram realizadas digestões *in vitro* (37 °C/6 h/150 rpm) para avaliar a bioacessibilidade dos compostos bioativos e a resistência dos ingredientes prebióticos às condições gastrointestinais. Os efeitos dos glico-oligossacarídeos e da dextrana foram avaliados na cepa probiótica *Lactocaseibacillus casei* (37 °C/ 24 h/ 150 rpm /pH 7). Este estudo gerou o conhecimento necessário para indicar o suco de acerola contendo glico-oligossacarídeos e dextrana como um possível prebiótico. Os glico-oligossacarídeos e dextrana resistiram as condições gastrointestinais simuladas, enquanto os compostos bioacessíveis, vitamina C e compostos fenólicos, aumentaram suas concentrações ao final da digestão *in vitro*. O processamento por ultrassom de alta intensidade aumentou a concentração de glico-oligossacarídeos em detrimento da dextrana. O processamento por ultrassom também aumentou a concentração de vitamina C e compostos fenólicos. Os carboidratos, pós digestão *in vitro*, foram usados como substratos pela bactéria probiótica, *Lactocaseibacillus casei*. O probiótico apresentou alto consumo de glico-oligossacarídeos e dextrana, diferentes perfis de multiplicação de células viáveis e produção de ácidos orgânicos e ácidos graxos de cadeia curta com base nas fontes de carbono disponíveis para consumo. Além disso, o processamento de ultrassom causou mudanças físico-estruturais na dextrana, o que aumentou sua fermentabilidade. O suco contendo glico-oligossacarídeos e dextrana processado por ultrassom por 6 minutos provocou as melhores respostas ao metabolismo do *Lactocaseibacillus casei*.

**Palavras-chave:** ultrassom de alta intensidade; glico-oligossacarídeos; dextrana; *Lactocaseibacillus casei*.

## ABSTRACT

Given the health benefits that the regular consumption of functional foods provides, the demand for prebiotic foods has been growing in and with it, research involving this product. The present study obtained a prebiotic acerola juice by synthesizing oligosaccharides directly into the juice using sugars as substrate. The gluco-oligosaccharides and dextran synthesis were carried out by dextransucrase enzyme (30 °C / 6 h / 100 rpm). The prebiotic juices were processed by high-intensity ultrasound (500 K / 2 min, 6 min and 10 min) to evaluate their effects on probiotic's growth. *In vitro* digestion was performed (37 °C / 6 h / 150 rpm) to evaluate the bioaccessibility of bioactive compounds and the prebiotic effect on the growth of the probiotic strain *Lactocaseibacillus casei* (37 °C / 24 h / 150 rpm / pH 7). The gluco-oligosaccharides and dextran resisted the simulated gastrointestinal conditions, while the bioaccessible compounds, vitamin C and phenolic compounds, increased their concentrations at the end of *in vitro* digestion. High-intensity ultrasound processing increased the concentration of gluco-oligosaccharides at the expense of dextran. Ultrasound processing also increases the concentration of vitamin C and phenolic compounds. Carbohydrates, after *in vitro* digestion, were used as substrates by the probiotic bacteria, *Lactocaseibacillus casei*. The probiotic showed high consumption of gluco-oligosaccharides and dextran, different profiles of viable cell multiplication and production of organic acids and short-chain fatty acids based on carbon sources available for consumption. In addition, ultrasound processing caused physico-structural changes in dextran, which increased its fermentability. The juice containing gluco-oligosaccharides and dextran processed by ultrasound for 6 minutes caused the best responses to the metabolism of *Lactocaseibacillus casei*.

**Keywords:** high-intensity ultrasound; gluco-oligosaccharides; dextran; *Lactocaseibacillus casei*

## SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO .....	14
2	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA .....	17
2.1	Oligossacarídeos prebióticos .....	17
2.2	Suco de acerola como um alimento funcional .....	20
2.3	Tecnologias não térmicas de processamento de alimentos .....	22
2.3.1	<i>Ultrassom</i> .....	23
2.4	Sistema digestório humano .....	25
2.4.1	<i>Digestão in vitro</i> .....	29
3	OBJETIVOS .....	31
3.1	Objetivo geral .....	31
3.1	Objetivos específicos .....	31
4	MATERIAS E MÉTODOS .....	32
4.1	Preparo e caracterização do suco de acerola .....	32
4.2	Produção da enzima Dextrana-Sacarase .....	32
4.3	Síntese dos glico-oligossacarídeos e dextrana prebióticos .....	33
4.4	Processamento por ultrassom .....	33
4.5	Ensaio de digestão semi-dinâmica in vitro e fermentação com o <i>Lacticaseibacillus casei</i> .....	34
4.5.1	<i>Ensaio de digestão in vitro</i> .....	34
4.5.2	<i>Ensaio Ativação do Lacticaseibacillus casei</i> .....	35
4.5.3	<i>Fermentação com o Lacticaseibacillus casei</i> .....	36
4.5.4	<i>Viabilidade do Lacticaseibacillus casei por contagem de células viáveis</i> .....	36
4.6	Métodos analíticos .....	36
4.6.1	<i>Viabilidade compostos fenólicos totais</i> .....	36
4.6.2	<i>Determinação de ácidos e açúcares por HPLC-UV</i> .....	37
4.6.3	<i>Quantificação de glico-oligossacarídeos durante a digestão</i> .....	37
4.6.4	<i>Atividade enzimática da Dextrana-Sacarase</i> .....	38
4.6.5	<i>Determinação da dextrana</i> .....	38
4.6.6	<i>Análises estatísticas</i> .....	38
5	RESULTADOS E DISCUSSÕES .....	39

5.1	Caracterização dos sucos de acerola .....	39
5.2	Efeitos da digestão dinâmica nos compostos dos sucos de acerola .....	40
5.2.1	<i>Resistência dos glico-oligossacarídeos e dextrana</i> .....	40
5.2.2	<i>Bioacessibilidade da vitamina C, compostos fenólicos e atividades antioxidantes</i> .....	43
5.3	Efeito dos sucos de acerola no metabolismo do <i>Lacticaseibacillus casei</i> .....	45
5.3.1	<i>Efeito do suco integral no Lacticaseibacillus casei</i> .....	45
5.3.2	<i>Efeito dos sucos contendo glico-oligossacarídeos e dextrana processados por ultrassom de alta intensidade no Lacticaseibacillus casei nos sucos processados</i> .....	47
6	CONCLUSÃO .....	53
	REFERÊNCIAS .....	54

## 1 INTRODUÇÃO

A inovação na indústria de alimentos está focada em abordagens científicas e técnicas no processamento de alimentos, juntamente com a introdução de novos alimentos funcionais (HURTADO-ROMERO *et al.*, 2020). Os alimentos funcionais são alimentos que apresentam propriedades benéficas ao organismo, além das nutricionais básicas do alimento. Os prebióticos são substratos que são utilizados seletivamente por alguns microrganismos, conferindo benefícios à saúde do hospedeiro (GIBSON *et al.*, 2017).

Os prebióticos após ingeridos são direcionados ao intestino e devem resistir à digestão, incluindo o baixo pH do estômago, hidrólise por enzimas intestinais e absorção gastrointestinal (GIBSON *et al.*, 2017). Os prebióticos podem ser consumidos como suplementos ou incorporados como ingredientes funcionais em muitos tipos de produtos alimentícios, incluindo leites e sucos de frutas. Em termos de produção, esses prebióticos são obtidos por extração de plantas; por hidrólise enzimática ou química de polissacarídeos vegetais; ou por síntese enzimática usando dissacarídeos ou outros substratos (CUNNINGHAM *et al.*, 2021). Diante dos diversos benefícios à saúde que o consumo regular de alimentos funcionais proporciona, a demanda por alimentos prebióticos vem crescendo nos últimos anos e com ela, as pesquisas envolvendo este produto.

A enzima dextrana-sacarase (E.C.2.4.1.5) de *Leuconostoc mesenteroides* B-512 é uma glicosiltransferase tradicionalmente aplicada para produzir dextrana em um meio contendo apenas sacarose como fonte de carbono. Quando, além da sacarose, outro carboidrato também está presente no meio reacional, as unidades de glicose se desviam da cadeia de dextrana e são transferidas por transglicosilação para uma molécula aceitadora, e assim, os oligossacarídeos prebióticos são sintetizados (ARAÚJO *et al.*, 2015).

Porém, os benefícios à saúde dependem da maneira de como são metabolizados, e as análises envolvendo a bioacessibilidade são essenciais para validar a maioria das alegações à saúde alimentar (CAICEDO-LOPEZ *et al.*, 2019). Modelos de digestão *in vitro* constituem um campo de pesquisa que vem mostrando grande promessa em facilitar o desenvolvimento de alimentos e formulações orais com base na melhor compreensão dos seus efeitos a microbiota intestinal (SHANI-LEVI *et al.*, 2017).

A definição de probióticos estabelece a necessidade de os microrganismos estarem vivos após a ingestão (sobreviver ao trato gastrointestinal e colonizar o cólon). O gênero *Lacticaseibacillus* está entre os microrganismos probióticos mais estudados devido ao seu potencial comercial, industrial e aplicado à saúde. Comercialmente, eles são usados para fermentar laticínios, geralmente produzindo alimentos com melhor sabor e textura. Também foi encontrado que eles produzem muitos metabólitos bioativos que podem conferir benefícios ao hospedeiro quando consumidos, seu poder probiótico (HILL *et al.*, 2018).

Nosso grupo investigou o metabolismo do *Bifidobacterium* e *Lacticaseibacillus* em sucos prebióticos de diferentes matrizes contendo glico-oligossacarídeos e dextrana, e demonstraram a estimulação do metabolismo dos probióticos (FONTES *et al.*, 2015; LEITE *et al.*, 2021; VERGARA *et al.*, 2010). LEITE *et al.* (2021) mostraram que glico-ligossacarídeos, dextrana e tagatose foram resistentes às condições gastrointestinais simuladas e estimularam o metabolismo das cepas probióticas em sistema estatico sem o controle de pH e agitação. Porém, cada microrganismo teve um comportamento diferente e preferencias no consumo de carboidratos. *Lacticaseibacillus casei* apresentou taxas máximas de multiplicação de células associadas a altas taxas de consumo de dextrana e oligossacarídeos.

Os sucos de frutas são naturais, apresentam um alto valor nutricional e diversos sabores, desta forma, é um produto que abrange um amplo grupo de consumidores (YILDIZ, 2019). A acerola (*Malpighia glabra L.*) é uma espécie nativa da América tropical e é considerada um fruto funcional devido ao seu alto teor de vitamina C e a presença de outros compostos bioativos como compostos fenólicos (HORTA *et al.*, 2016).

Recentemente, o ultrassom tem sido estudado na modificação das propriedades funcionais e físico-químicas de alguns compostos, o que pode potencialmente aumentar seu potencial prebiótico. Em um estudo recente, avaliou-se o efeito da extração de frutanos de cadeia longa. Os resultados mostraram que os frutanos semelhantes à inulina podem ser obtidos com um grau de polimerização entre 32 e 42. Além disso, os compostos extraídos foram incubados com algumas cepas probióticas de *Bifidobacterium* e *Lacticaseibacillus*, onde foi observado que a proliferação de ambas as cepas bacterianas (ZEAITER *et al.*, 2019). No entanto, os estudos sobre o efeito de alimentos prebióticos processados por ultrassom sobre a sua fermentabilidade por probióticos, ainda são subestimados e escassos

(CANTU-JUNGLES *et al.*, 2021; SILVA *et al.*, 2020).

Este estudo teve como objetivo investigar o efeito do suco de acerola processado por ultrassom de alta intensidade contendo glico-oligossacarídeos e dextrana, pós a digestão *in vitro*, no metabolismo do *Lactocaseibacillus casei*.

## 2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1 Oligossacarídeos prebióticos

Os alimentos funcionais estão se tornando mais relevantes devido a uma demanda crescente derivada do aumento dos custos dos cuidados à saúde, o aumento constante da expectativa de vida e o desejo de um melhor bem-estar físico e mental (HURTADO-ROMERO *et al.*, 2020). De acordo com o *Functional Food Center*, alimentos funcionais são definidos como alimentos naturais ou processados que contêm compostos biologicamente ativos e fornecem um benefício para a saúde clinicamente comprovado e documentado para a prevenção, gestão ou tratamento de doenças crônicas (MARTIROSYAN; SINGH, 2015).

Esses alimentos podem ser consumidos em dietas convencionais e demonstram a aptidão para regular as funções corporais de forma a auxiliar na proteção contra algumas doenças como hipertensão, diabetes, câncer, osteoporose e coronariopatias (MANACH *et al.*, 2017).

Nos últimos anos houve um considerável aumento no número de publicações a respeito de alimentos funcionais e espera-se que o mercado global de prebióticos cresça cerca de 12,7% até 2025, obtendo um lucro de aproximadamente U \$ 10,55 bilhões (CEZAR *et al.*, 2018). Neste campo de pesquisa, os oligossacarídeos prebióticos têm sido cada vez mais estudados como alimentos funcionais, e por isso, esforços de pesquisa significativas estão atualmente se concentrando na busca, produção ou síntese de ingredientes com potencial prebiótico.

Os prebióticos são definidos como substratos utilizados seletivamente pelos microrganismos do hospedeiro, resultando em benefícios para a saúde metabólica, sistema gastrointestinal, saúde óssea e saúde mental. Algumas fibras dietéticas, especialmente oligossacarídeos são bem reconhecidas na literatura como prebióticos (GIBSON *et al.*, 2017). Prebióticos fazem parte da tendência de alimentos funcionais com novos nutrientes ou componentes adicionais que não são normalmente encontrados em um alimento específico (rotulados como “produtos enriquecidos”). Inulina, fruto-oligossacarídeos (FOS), galacto-oligossacarídeos (GOS) e xilo-oligossacarídeos (XOS) são os prebióticos à base de carboidratos mais estudados e bem estabelecidos (ZHONG *et al.*, 2020).

Os prebióticos exercem um impacto positivo na saúde por meio de mecanismos específicos que consistem principalmente na fermentação do substrato no cólon e alterações na microbiota intestinal relacionadas a esse processo. Mecanismos importantes são: (i) a competição de microrganismos intestinais por prebióticos, resultando na colonização seletiva de bactérias benéficas e na exclusão de patógenos em células epiteliais intestinais; (ii) a produção de ácidos graxos de cadeia curta (SCFAs); e (iii) a modulação da resposta imune, potencializando a função de barreira intestinal (GIBSON *et al.*, 2017; HURTADO-ROMERO *et al.*, 2020).

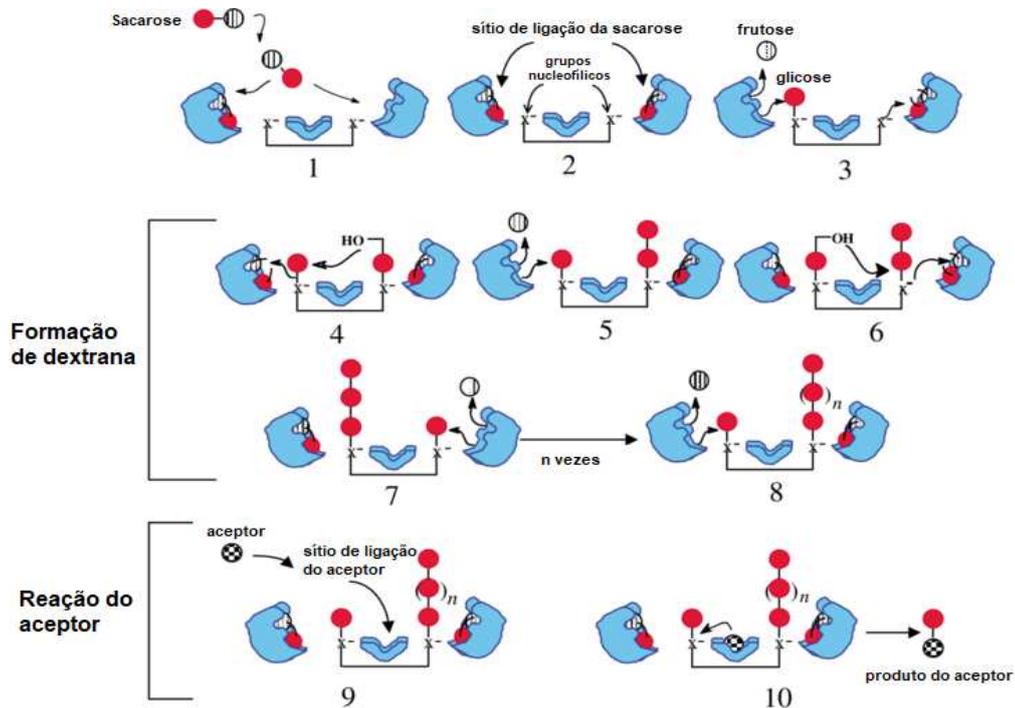
Os benefícios para a saúde associados a esses mecanismos são bem documentados em vários estudos, sugerindo que a ingestão de prebióticos pode aumentar a biodisponibilidade e a absorção de minerais, reduzir a inflamação e os sintomas associados a distúrbios gastrointestinais, reduzir a prevalência e a duração da diarreia infecciosa e associada a antibióticos e até mesmo prevenir o Câncer de cólon. Além disso, os prebióticos têm mostrado potenciais efeitos terapêuticos contra a obesidade e distúrbios metabólicos relacionados, além de uma função imunológica melhorada por meio da regulação da expressão de citocinas (SHOKRYAZDAN *et al.*, 2017).

Os prebióticos são utilizados em diversas formulações de alimentos, como bebidas, panificação, carnes e laticínios, para potencializar seu potencial saudável ou para melhorar suas propriedades tecnológicas. Eles melhoram as características sensoriais, como o frescor, e fornecem uma composição nutricional mais bem balanceada porque são frequentemente usados como fibra alimentar e adicionados como um ingrediente de volume de baixo teor energético (FERREIRA-LAZARTE *et al.*, 2019).

Em termos de produção, esses prebióticos são obtidos por extração de plantas; por hidrólise enzimática ou química de polissacarídeos vegetais; ou por síntese enzimática usando dissacarídeos ou outros substratos (CUNNINGHAM *et al.*, 2021). As enzimas mais utilizadas são as hidrolases de glicosídeos, glicosiltransferases e transglicosilases. A enzima dextrana-sacarase (E.C.2.4.1.5) de *Leuconostoc mesenteroides* B-512 é uma glicosiltransferase tradicionalmente aplicada para produzir dextrana em um meio contendo apenas sacarose como fonte de carbono. Quando, além da sacarose, outro carboidrato também está presente no meio reacional, as unidades de glicose se desviam da cadeia de dextrana e são

transferidas por transglicosilação para uma molécula receptora. Essa reação é chamada de reação do aceptor e o principal aceptor estudado para a dextrana-sacarase é a maltose, que forma isomalto-oligossacarídeos com um grau de polimerização de 1 a 10 (ARAÚJO *et al.*, 2015; HEINCKE *et al.*, 1999). A figura 1 esquematiza a reação catalisada pela enzima dextrana-sacarase.

**Figura 1.** Mecanismo de síntese de dextrana e reação do aceptor da dextrana-sacarase.



**Fonte:** Adaptado de PLOU *et al.* (2002).

Diante dos efeitos benéficos apresentados pelos alimentos funcionais, a busca por alimentos adicionados de prebióticos vem crescendo, e com ela, as pesquisas envolvendo o assunto. Recentemente, o foco vem sendo em veículos alternativos ao leite para oligossacarídeos prebióticos, tais como, os sucos de frutas (ALMEIDA *et al.*, 2015; COELHO *et al.*, 2015).

Atualmente, os oligossacarídeos prebióticos são incorporados, em sua maioria, em produtos lácteos. No entanto, alguns consumidores evitam produtos lácteos devido a alergia ao leite, intolerância à lactose ou vegetarianismo. Por outro lado, o consumo de sucos de frutas vem aumentando devido ao seu valor nutricional e diversidade de sabores (ALVES FILHO *et al.*, 2018; YILDIZ, 2019). Os sucos de frutas são caracterizados pelo alto conteúdo de compostos bioativos, especialmente

polifenóis (principalmente flavonoides e ácidos fenólicos) (NOWAK *et al.*, 2018). A inserção de compostos prebióticos como fibra alimentar solúvel tem sido relatada como uma forma de melhorar os efeitos benéficos dos sucos de frutas para a saúde humana (COELHO *et al.*, 2015; RABELO; FONTES; RODRIGUES, 2009; VERGARA *et al.*, 2010).

Foi evidenciado em um trabalho do nosso grupo que o uso do suco de acerola (adicionado de açúcares externos e pH ajustado para 5,2) como substrato para a síntese de oligossacarídeos prebióticos através da enzima dextrana-sacarase é uma boa alternativa, pois foi encontrada alta conversão de açúcar em oligossacarídeos (>80%), oligossacarídeos com alto grau de polimerização e baixo rendimento de dextrana (ARAÚJO *et al.* 2015).

Durante a síntese de oligossacarídeos com dextrana-sacarase pela reação do aceptor, a formação de dextrana é minimizada, mas não evitada. A dextrana pode ser utilizada como espessante de alimentos e também pode ser atraente também como um suplemento funcional com efeitos benéficos para a saúde. A dextrana pode desempenhar um papel como prebiótico, mas as informações ainda não são conclusivas. Além disso, pouco se sabe sobre a capacidade da dextrana em promover o metabolismo de bactérias intestinais que produzem ácidos graxos de cadeia curta, como acetato, propionato e butirato (AMARETTI *et al.*, 2020).

Os prebióticos são caracterizados pela resistência à digestão e às condições ácidas do trato gastrointestinal e à capacidade de atingir o cólon sem alteração em sua estrutura física.

## **2.2 Suco de acerola como um alimento funcional**

*Malpighia glabra*, popularmente chamada de “acerola” no Brasil, é uma espécie nativa da América tropical. A acerola é considerada um fruto funcional devido ao seu alto teor de vitamina C ou ácido ascórbico (2.000 a 3.000 mg/100g de suco). Entretanto, além da vitamina C, a acerola apresenta outros compostos químicos com potencial benéfico à saúde, entre eles tiamina, riboflavina, niacina, fibras, minerais, carotenoides, flavonóides e antocianinas. As quantidades desses compostos dependem das cultivares, das condições ambientais e do estágio de maturação das frutas (HORTA *et al.*, 2016; SERAGLIO *et al.*, 2018). O Brasil é

pioneiro na comercialização e exportação de produtos processados a partir de acerola, como frutas congeladas, suco, melados, concentrado congelado, geleia e licor (DELVA; SCHNEIDER, 2013).

O ácido ascórbico é um potente composto bioativo antioxidante presente naturalmente em alimentos de origem vegetal, em especial, na acerola. O ser humano é incapaz de produzir ácido ascórbico, pois não possui a enzima *L-glucono-1,4-lactona*, devendo-se adquirir esse composto através da alimentação, principalmente de vegetais. A *Food and Agriculture Organization* (FAO, 2001) determina que a recomendação de ingestão diária de vitamina C adequada é 90 mg/dia para homens e 75 mg/dia para mulheres (BELWAL *et al.*, 2018). A vitamina C tem múltiplas funções no organismo: é necessária para a produção e manutenção do colágeno; é responsável pela cicatrização de feridas, fraturas, contusões e sangramentos gengivais; e reduz a suscetibilidade à infecção, desempenha papel na formação de dentes e ossos, aumenta a absorção de ferro (DU *et al.*, 2013). Extratos de acerola podem proteger contra o dano oxidativo através da diminuição do apoptose e dos níveis intracelulares de espécies reativas de oxigênio e melhorar a atividade de enzimas antioxidantes (ALVAREZ-SUAREZ *et al.*, 2017).

Outra classe de constituintes principais dos frutos de acerola são os compostos fenólicos, incluindo derivados do ácido benzoico (ácido gálico e ácido siríngico), fenilpropanoides (ácido cafeico, ácido ferúlico, etc.), flavonóides e antocianinas (BELWAL *et al.*, 2018). Os compostos fenólicos são metabólitos secundários que desempenham diversas funções nos organismos e o consumo regular de produtos ricos nestes compostos tem sido associado à redução dos riscos de câncer, obesidade, doenças cardiovasculares e outras doenças crônicas (AHMAD *et al.*, 2016; BOEING *et al.*, 2014).

Os carotenoides são pigmentos naturais encontrados na natureza. Nas frutas como acerola, estes pigmentos naturais, tais como o  $\beta$ -caroteno e o licopeno, estão envolvidos nas cores amarela e vermelho dos frutos. Além disso, alguns carotenoides podem ser convertidos em vitamina A e atuam como agentes antioxidantes (BELWAL *et al.*, 2018).

Sucos de frutas são fontes de compostos bioativos tais como vitaminas, compostos fenólicos e carotenoides, que podem reduzir os riscos de desenvolvimento de doenças cardiovasculares e neurodegenerativas, e alguns tipos de câncer. Entretanto, apenas a presença desses biocompostos nos alimentos não é

o bastante para atribuir as propriedades funcionais. É necessário saber a proporção desses compostos que está disponível para exercer a função biológica (Y. ABOUL-ENEIN; BERCZYNSKI; KRUK, 2013) e analisar como o processo de digestão afeta os compostos bioativos e sua estabilidade, o que conseqüentemente, afetará sua biodisponibilidade e seus possíveis efeitos benéficos (CARBONELL-CAPELLA *et al.*, 2014).

### **2.3 Tecnologias não térmicas de processamento de alimentos**

Atualmente, os processamentos térmicos são as tecnologias de processamentos mais utilizadas na indústria de alimentos para inativar enzimas e microrganismos que podem comprometer a qualidade e segurança do produto. Entretanto, o processamento térmico tradicional pode apresentar vários efeitos indesejáveis em produtos alimentícios, como desnaturação de proteínas, lactose, perda de vitaminas e certos compostos bioativos (SALVE; PEGU; ARYA, 2019; SILVA; ROSA; MEIRELES, 2015).

Nos últimos anos, várias tecnologias de processamento não térmico foram desenvolvidas para satisfazer as necessidades da indústria e do consumidor, tais como ultrassom, alta pressão, processamento ôhmico, luz UV pulsada, plasma frio e ozônio, dentre outras. Os processamentos não térmicos parecem ser menos prejudiciais aos produtos do que os processamentos térmicos, entretanto, seus efeitos variam consideravelmente de uma matriz alimentar para outra (ALMEIDA *et al.*, 2015; OLIVEIRA *et al.*, 2018).

O conhecimento sobre os compostos que sofrem alterações após o processamento de alimentos é uma parte importante do desenvolvimento de produtos alimentícios. A composição dos alimentos pode influenciar sob diversos fatores como: sabor, aroma, cor e propriedades bioativas (ALVES-FILHO *et al.*, 2018).

Diante disso, faz-se necessário estudos dessas tecnologias emergentes para determinar seus efeitos sobre compostos bioativos e como a bioacessibilidade desses compostos pode ser afetada pelo processamento desses produtos.

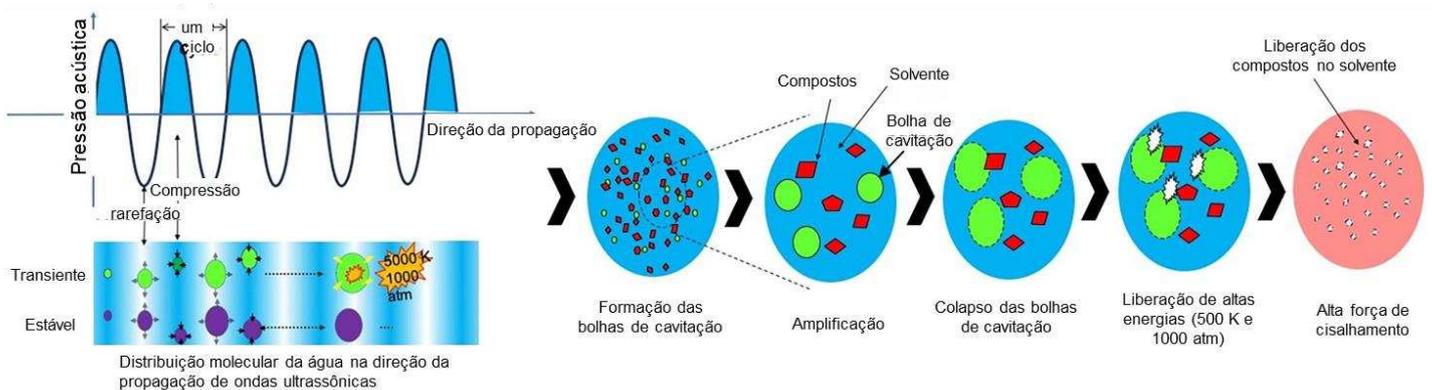
### 2.3.1 Ultrassom

O ultrassom é uma onda sonora com frequência de > 16-20 kHz, superior ao que o ser humano pode perceber. Dispositivos de ultrassom funcionam com frequências de 20 kHz até vários GHz. O ultrassom de baixa intensidade é caracterizado por frequências superiores a 100 kHz e intensidade abaixo de 1 W/cm<sup>2</sup>, enquanto o ultrassom de alta intensidade é caracterizado por frequências entre 20 e 500 kHz e intensidade superiores a 1 W/cm<sup>2</sup> (DOLAS; SARAVANAN; KAUR, 2019; ZHENG; GUIMARÃES *et al.*, 2019).

Uma das principais formas de se classificar o ultrassom é em baixa potência e alta potência. No ultrassom de baixa potência, o princípio básico implica que quando o som é propagado através da matriz alimentar como ondas mecânicas, ele causa compressão e descompressão alternadas, provocando variações na velocidade e atenuação do som. Já no ultrassom de alta potência, princípio básico utilizado é quando em intensidades mais altas são aplicadas é induzido a cavitação acústica devido à geração, crescimento e colapso de grandes bolhas, o que causa um aumento localizado de temperatura e pressão. A sonicação pode estar associada a outras tecnologias tais como: termossonicação, manossonicação, manotermossonicação (ALZAMORA, 2011; AWAD *et al.*, 2012). A figura 2 esquematiza o fenômeno de cavitação acústica.

O ultrassom vem sendo estudado como uma técnica inovadora no processamento não térmico de matrizes alimentícias, que promete aprimorar os atributos de qualidade do produto sem diminuir o teor de compostos bioativos (CHEOK *et al.*, 2013; GUIMARÃES *et al.*, 2019). Nos últimos anos, extrações assistidas por ultrassom têm sido amplamente estudadas para isolar polissacarídeos, como fibras, de diferentes matrizes vegetais. Em comparação com outros métodos convencionais, essa tecnologia facilita a transferência de massa e aumenta a eficiência de extração, reduzindo o tempo de extração e energia, tendo a vantagem de obter compostos termolábeis (CHEMAT *et al.*, 2017).

**Figura 2.** Fenômeno de cavitação acústica. Bolhas de gás são formadas e implodem violentamente, criando ondas de choque, resultando na liberação de alta energia pontual na forma de temperatura (500 K) e pressão (1000 atm). O fenômeno de cavitação ocasiona mudanças químicas, térmicas e mecânicas.



**Fonte:** adaptado de FU *et al.* (2020)

Além disso, o uso do US na extração de fibras pode oferecer o benefício de diminuir a massa molecular dos compostos isolados. Além disso, o US têm sido explorado para modificar fisicamente os polissacarídeos (quebrando as ligações químicas) para melhorar suas propriedades funcionais sem o uso de produtos químicos potencialmente tóxicos. Essa quebra pode alterar a hidrofiliabilidade da superfície, o que aumenta a solubilidade e a capacidade de retenção de água e aumenta a bioatividade após a liberação de compostos bioativos (SPOTTI; CAMPANELLA, 2017).

O uso do US tem mostrado modificar as propriedades funcionais e físico-químicas de alguns compostos, o que pode potencialmente aumentar seu potencial prebiótico. Em um estudo recente, avaliou-se o efeito da extração de frutanos de cadeia longa, em combinação com precipitação convencional com etanol. Os resultados mostraram que os frutanos semelhantes à inulina podem ser obtidos com um grau de polimerização entre 32 e 42. Além disso, os compostos extraídos foram incubados com algumas cepas probióticas de *Bifidobacterium* e *Lactiseibacillus*, onde foi observado que a proliferação de ambas as cepas bacterianas (ZAITER *et al.*, 2019).

O processamento por ultrassom (28 kHz/420 W/20 °C/30–90 min) em suco de toranja aumentou significativamente a concentração de ácido ascórbico

(28%), compostos fenólicos totais (9%) e flavonoides equivalentes a quercetina e catequina (8%-30%). O aumento do ácido ascórbico se deve ao processo de extração por ruptura de membrana e à remoção do oxigênio devido à cavitação, evitando-se assim a oxidação do ácido ascórbico. O aumento dos compostos fenólicos pode ser atribuído à liberação da forma ligada do conteúdo fenólico devido à quebra da parede celular pela pressão de cavitação exercida sobre ela durante a sonicação. Também pode ser devido à adição do grupo hidroxila produzido por sonicação ao anel aromático de compostos fenólicos (AADIL *et al.*, 2013).

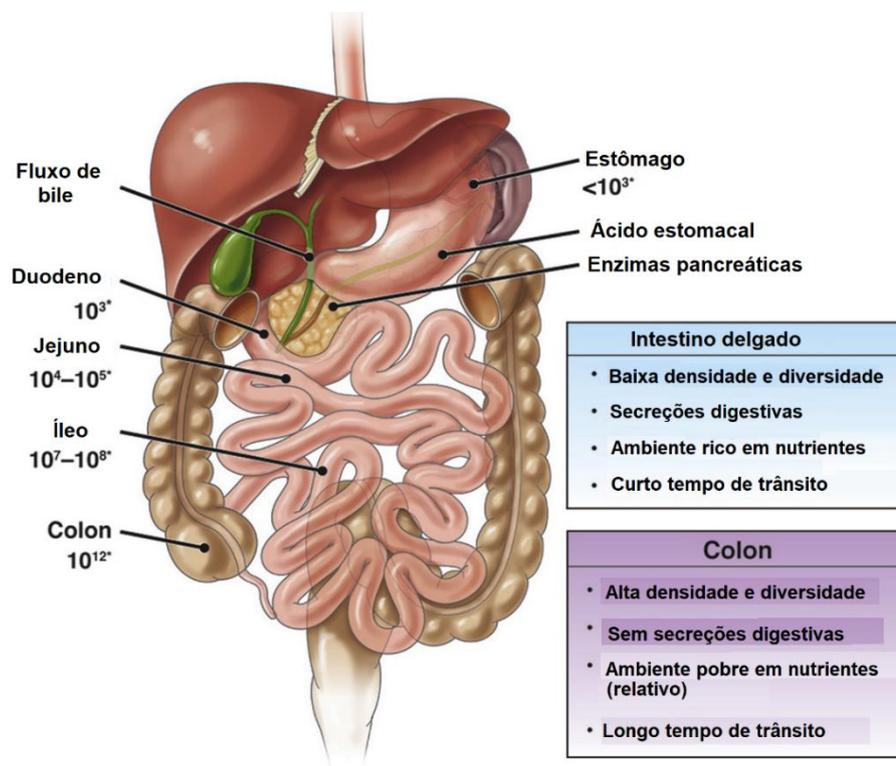
O processamento por ultrassom de uma solução de fruto-oligossacarídeos (FOS, 70 g/L; 600-1200 W por 5 min) não apresentou mudanças significativas na sua concentração ou grau de polimerização. Ao contrário do que é relatado para os tratamentos térmicos, essas tecnologias não térmicas foram consideradas adequadas para o processamento de FOS. Ao contrário do que é relatado para os tratamentos térmicos, essa tecnologia não térmica foi considerada adequada para o processamento de FOS (ALVES FILHO *et al.* 2016).

Diante disso, podemos afirmar que a eficiência do ultrassom, e as mudanças nos compostos bioativos dos sucos de frutas após os processamentos, variam de matriz para matriz e dependendo dos parâmetros operacionais aplicados, e por isso, se faz necessário mais estudos. Além disso, a maioria dos trabalhos com ultrassom frio são focados no controle microbiológico. Há poucos estudos que mostrem que o ultrassom pode ser usado para melhorar o efeito prebiótico do suco, além da estabilidade dos compostos bioativos.

## **2.4 Sistema digestório humano**

O sistema digestório é o sistema do corpo humano responsável pelo processamento dos alimentos ingeridos, absorção de nutrientes e a eliminação do que não será utilizado pelo corpo. Esse processamento é garantido graças à ação de vários órgãos que compõem o canal alimentar (boca, a faringe, o esôfago, o estômago, o intestino delgado, o intestino grosso e o ânus), bem como pela presença de glândulas acessórias (glândulas salivares, o pâncreas e o fígado), que sintetizam substâncias que são essenciais no processo de digestão (FERREIRA-LAZARTE *et al.*, 2019). A Figura 3 esquematiza o trato digestivo e suas características distintivas.

**Figura 3.** Visão geral da densidade de colônias bacterianas ao longo do trato digestivo e características distintas do intestino delgado e do cólon.



**Fonte:** Adaptado de KASTL *et al.* (2020).

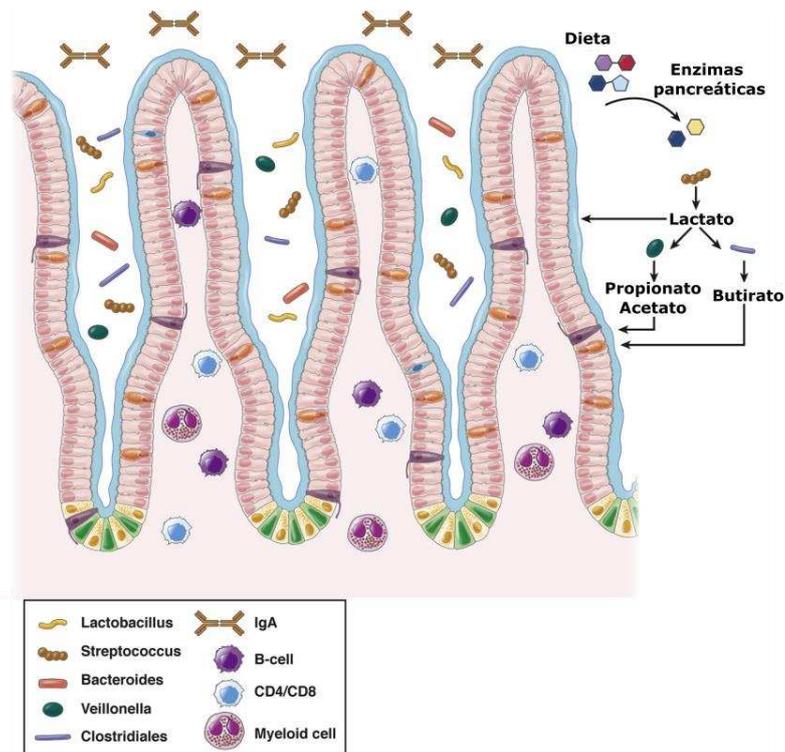
O estômago é o órgão dilatado do sistema digestório e está localizado logo abaixo do diafragma. Nesse órgão, o bolo alimentar sofre a ação do suco gástrico com o auxílio da atividade muscular do órgão. O suco gástrico é composto pela pepsina, que atua na digestão de proteínas, e o ácido clorídrico, que torna o pH do estômago baixo e promove a ativação da pepsina (KASTL *et al.*, 2020).

O intestino delgado é porção mais longa do sistema digestório, dividida em três segmentos: o duodeno, o jejuno e o íleo. Nessa porção do sistema digestório, a digestão é finalizada e há o início da absorção de nutrientes. O órgão é responsável pela maior parte do processo de digestão. Na primeira porção, chamada de duodeno, o quimo, alimento digerido pelo estômago, sofre a ação do suco pancreático, da bile e do suco entérico. A secreção pancreática, rica em bicarbonato, ajuda a neutralizar a acidez. Além disso, apresenta enzimas diversas, como a tripsina e a quimiotripsina, que atuam nas proteínas. A bile, produzida pelo fígado e armazenada na vesícula biliar, atua como emulsificante, facilitando a digestão dos

lipídios. Já o suco entérico é rico em enzimas, como a aminopeptidase (atua nos aminoácidos), nucleosidases e fosfatases (agem nos nucleotídeos). O jejuno e íleo, as porções seguintes do intestino delgado, atuam, principalmente, na absorção de nutrientes, graças à presença de vilosidades e microvilosidades. As vilosidades são dobras no revestimento do intestino, enquanto as microvilosidades são projeções nas células epiteliais da vilosidade (KASTL *et al.*, 2020).

O intestino delgado é um ambiente hostil para a vida microbiana devido ao curto tempo de trânsito, ao influxo de enzimas digestivas e bile e ao fornecimento intermitente de substrato alimentar. Como resultado, as populações bacterianas nesta região do trato intestinal têm uma população menor, são menos diversificadas, mas são mais dinâmicas, dada a necessidade de responder às mudanças rápidas das condições luminiais (KASTL *et al.*, 2020). A Figura 4 esquematiza os gêneros de bactérias comumente encontrados no intestino delgado e produção de ácidos graxos de cadeias curtas.

**Figura 4.** Gêneros de bactérias comumente encontrados no intestino delgado e produção de ácidos graxos de cadeias curtas.



Fonte: Adaptado de KASTL *et al.* (2020)

O intestino grosso é órgão responsável pela absorção de água e formação da massa fecal. Além disso, divide-se em ceco, cólon e reto. No ceco, observa-se uma projeção chamada de apêndice, bastante conhecida por sua inflamação (apendicite). O reto termina em um estreito canal, chamado de canal anal, o qual se abre para o exterior no ânus, por onde as fezes são eliminadas. O cólon é onde se localiza a microbiota intestinal. A microbiota intestinal pode ser definida com um ecossistema complexo composto por diversos microrganismos simbióticos ( $10^{12}$  a  $10^{14}$  UFC/mL) que é essencial para a saúde por estar associada a vários mecanismos nutricionais, metabólicos, endócrinos, imunológicos e psicológicos. Suas principais funções são de manutenção da barreira intestinal, imunomodulação, metabolismo de nutrientes, síntese de compostos bioativos e vitaminas e fermentação de carboidratos não digeríveis (CLARK; MACH, 2016; RODRIGUES *et al.*, 2019)

Os mecanismos pelos quais a microbiota intestinal afeta a saúde dos indivíduos podem ser parcialmente mediados pelos ácidos graxos de cadeia curta (AGCCs), que são os produtos mais abundante da fermentação bacteriana de fibras alimentares não digeridas. Os ácidos graxos de cadeia curta podem ativar receptores acoplados à proteína G, incluindo os receptores de ácidos graxos livres 2 e 3, inibem a histona desacetilase e podem ser usados como substrato energético, afetando positivamente os processos fisiológicos dos indivíduos. Níveis intestinais reduzidos de AGCCs ou de bactérias intestinais produtoras de AGCCs são frequentemente encontrados em pacientes com doença inflamatória intestinal, obesidade, diabetes tipo 2 e doenças autoimunes (NAGPAL *et al.*, 2018; SUN *et al.*, 2017).

Devido à importância da microbiota intestinal na manutenção da saúde do consumidor, empresas no ramo de alimentos e farmacêuticas vem lançando novos produtos contendo culturas probióticas, associadas ou não a prebióticos. Para que uma única cepa atinja o status probiótico, é necessário avaliar sua resistência ao processo de digestão e sua capacidade de promover benefícios à saúde. A resistência aos processos de fabricação industrial também é muito importante para a seleção de linhagens probióticas (TRIPATHI; GIRI, 2014; VINDEROLA *et al.*, 2017).

*Lactocaseibacillus* e *Bifidobacterium* estão entre os microrganismos probióticos mais encontrados. Existem mais de 200 espécies de *Lactocaseibacillus*, o maior e mais diversos gêneros de bactérias ácido lácticas, fazendo parte da

microbiota de humanos e animais onde podem colonizar o trato gastrointestinal. O grupo *Lacticaseibacillus casei*, composto principalmente pelas espécies *Lacticaseibacillus casei*, *Lacticaseibacillus paracasei* e *Lacticaseibacillus rhamnosus*, estão entre as espécies mais encontradas devido ao seu potencial comercial, industrial e aplicado à saúde. Comercialmente, eles são usados para fermentar laticínios, geralmente produzindo alimentos com melhor sabor e textura. Também foi encontrado que eles produzem muitos metabólitos bioativos que podem conferir benefícios ao hospedeiro quando consumidos, seu poder probiótico (HILL *et al.*, 2018; ZHENG *et al.*, 2020).

#### **2.4.1 Digestão *in vitro***

A digestão *in vitro* é um campo de pesquisa que vem mostrando grande promessa em facilitar o desenvolvimento de alimentos e formulações orais com base na melhor compreensão de seu destino digestivo no estômago e no intestino delgado, bem como seus efeitos a microbiota intestinal. Métodos *in vitro* simulando processos de digestão são amplamente utilizados para estudar o comportamento de alimentos ou produtos farmacêuticos (SHANI-LEVI *et al.*, 2017).

A eficácia dos compostos funcionais dos produtos alimentares pode ser assegurada por meio de modelos de digestão *in vitro*, avaliando a bioacessibilidade e a biodisponibilidade desses compostos. A bioacessibilidade corresponde à fração de substância bioativa que é liberada da matriz alimentar após a digestão e solubilizada no lúmen intestinal para captação na mucosa intestinal. A biodisponibilidade é definida como a fração de nutrientes secretados na circulação que está disponível para absorção e metabolismo dos tecidos. É necessário que os biocompostos sejam liberados da matriz alimentar pela ação de enzimas digestivas (intestino delgado) e microbiota bacteriana (intestino grosso) para que se tornem bioacessíveis e, portanto, potencialmente biodisponíveis (FERRUZZI, 2010).

Embora os estudos nutricionais em humanos ainda estejam sendo considerados o “padrão ouro” para abordar questões relacionadas à dieta, os métodos *in vitro* têm as vantagens de serem mais rápidos, mais baratos, menos trabalhosos e não apresentar restrições éticas. Isso permite que um número relativamente grande de amostras seja medido em paralelo para fins de triagem. A reprodutibilidade, a escolha de condições controladas e a amostragem fácil no local

de interesse tornam os modelos *in vitro* muito adequados para investigar as mudanças físico-químicas luminais nos alimentos, questões de bioacessibilidade e alguns aspectos de biodisponibilidade. (ASCHOFF *et al.*, 2015; BRODKORB *et al.*, 2019; MINEKUS *et al.*, 2014; STINCO *et al.*, 2012).

Isso levou a uma grande variabilidade nos esforços científicos e estimulou o esforço recente da rede INFOGEST de cientistas para desenvolver um modelo de digestão *in vitro* estático e consensual harmonizado com base em condições fisiologicamente relevantes obtidas de humanos. Com base nesse modelo, vem-se buscando desenvolver e aplicar modelos mais sofisticados que se destinam a ser mais realistas, abrangendo vários aspectos da dinâmica da digestão (ALMADA-ÉRIX *et al.*, 2021). Apesar do crescente aumento nas pesquisas no campo da compreensão da digestão dos alimentos, ainda há muito espaço para novos avanços (BRODKORB *et al.*, 2019; MULET-CABERO *et al.*, 2020; SHANI-LEVI *et al.*, 2017).

Tendo em vista os aspectos observados, as modificações causadas pelos processamentos podem alterar significativamente a liberação, transformação e absorção de certos nutrientes e biocompostos durante a digestão, assim como, afetar a composição da microbiota intestinal. Já se sabe que o processamento térmico modifica a matriz alimentar, por outro lado, há poucos trabalhos sobre a influência dos processamentos não térmicos sobre os compostos funcionais dessas matrizes. Além disso, sabe-se ainda menos sobre o efeito prebiótico pós processamento não térmico e digestão *in vitro* no metabolismo de culturas probióticas, o que fez dessa dissertação ter de grande importância nas áreas de alimentos funcionais e tecnologias de processamento não térmicas.

### 3 OBJETIVOS

#### 3.1 Objetivo geral

Estudar o efeito dos sucos de acerola contendo glico-oligossacarídeos e dextrana e o efeito do ultrassom de alta intensidade no metabolismo do microrganismo *Lacticaseibacillus casei*.

#### 3.2 Objetivos específicos

- ✓ Sintetizar os prebióticos, glico-oligossacarídeos e dextrana no suco de acerola;
- ✓ Avaliar o efeito do ultrassom de alta intensidade sob a digestibilidade dos ingredientes prebióticos e bioacessibilidade dos compostos funcionais nas etapas de digestão gastrointestinal *in vitro*;
- ✓ Avaliar o efeito dos glico-oligossacarídeos e dextrana presentes nos sucos prebióticos, no metabolismo do microrganismo probiótico: *Lacticaseibacillus casei*;
- ✓ Avaliar a produção de ácido láctico e ácidos graxos de cadeia curta pelo *Lacticaseibacillus casei*.

## 4 MATERIAS E MÉTODOS

### 4.1 Preparo e caracterização do suco de acerola

A matéria-prima utilizada foi a polpa congelada de acerola (*Malpighia emarginata*) adquirida de um produtor local (Frute, Fortaleza-CE, Brasil). O produto foi mantido congelado (-20 °C) até a utilização. A diluição realizada foi utilizando água destilada na proporção 1:3 (v/v), de acordo com as instruções do fabricante.

Foram analisados 3 tipos de sucos: não prebiótico “in natura”, prebiótico (contendo oligossacarídeos e dextrana sintetizados pela enzima dextrana-sacarase) não processado e processado por ultrassom. Ambos foram caracterizados quanto ao teor de açúcares e vitamina C (ácido ascórbico) por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), segundo metodologia descrita por FONTELES *et al.* (2016) com adaptações.

As formulações dos sucos estudados estão descritas na Tabela 1.

**Tabela 1.** Descrição dos sucos de acerola estudados para avaliar o efeito do ultrassom no suco prebiótico de acerola.

SUCOS	DESCRIÇÃO
1	Suco <i>in natura</i>
2	Suco contendo glico-oligossacarídeos e dextrana
3	Suco contendo glico-oligossacarídeos e dextrana processado por ultrassom 500 W por 2 minutos
4	Suco contendo glico-oligossacarídeos e dextrana processado por ultrassom 500 W por 6 minutos
5	Suco contendo glico-oligossacarídeos e dextrana processado por ultrassom 500 W por 10 minutos

### 4.2 Produção da enzima Dextrana-Sacarase

A enzima dextrana-sacarase (E.C.2.4.1.5) foi produzida pela bactéria *Leuconostoc mesenteroides* B512 F, por meio de processo fermentativo em batelada previamente estabelecido por nosso grupo de pesquisa, segundo metodologia descrita por (RODRIGUES, S.; LONA; FRANCO, 2003). A enzima obtida foi estocada a - 20 °C.

### 4.3 Síntese dos glico-oligossacarídeos e dextrana prebióticos

A síntese de oligossacarídeos no suco de acerola foi desenvolvida de acordo com o protocolo previamente estabelecido por nosso grupo utilizando a enzima dextrana-sacarase (ARAÚJO *et al.*, 2015; COELHO *et al.*, 2015). Devido ao baixo teor de açúcar, sacarose e açúcares redutores (frutose e glicose) foram adicionados ao suco para alcançar a concentração desejada de 75 g/L. Os aceptores (glicose e frutose) foram ajustados para atingir proporções equimolares (1:1). O pH do suco foi ajustado para 5,2 (ótimo para a síntese enzimática) com NaOH 1 M e a atividade enzimática foi ajustada para 1 UI/mL. A síntese foi realizada a temperatura ambiente por 6 h sob agitação. Após a síntese o pH foi ajustado para o seu valor inicial foi mantido congelado (-20 °C) até a utilização.

### 4.4 Processamento por ultrassom

Amostras de 200 mL do suco foram postas em um reator de vidro encamisado de 250 mL e processadas em um Desruptor/Sonicador Ultrassônico (Ultronique QR500) de 500 W com frequência constante de 19 kHz e macro ponta de titânio de 13 mm de diâmetro a 25 °C. A macro ponta de titânio foi submersa no suco em uma profundidade de 1,5 cm. A intensidade de energia ultrassônica dissipada pela ponta de titânio é calculada de acordo com a Equação 1 (LI; PORDESIMO; WEISS, 2004).

**Figura 5.** Equipamento de ultrassom.



$$I = P/\Pi r^2 \quad (1)$$

Onde,

r é o raio (cm) da macro ponta de titânio e P (Watt) é a potência aplicada. A temperatura foi controlada durante todo o processamento em 25 °C.

A potência aplicada foi de 500 W e intensidade de energia ultrassônica dissipada durante o processamento foi de 376 W/cm<sup>2</sup>. Os tempos de processamentos dos sucos foram de 2, 6 e 10 minutos (OLIVEIRA *et al.*, 2018).

#### 4.5 Ensaios de digestão semi-dinâmica *in vitro* e fermentação com o *Lactocaseibacillus casei*

**Figura 6.** Sistema *semi-dinâmico* de digestão *in vitro* e de fermentação com o *Lactocaseibacillus casei*.



##### 4.5.1 Ensaios de digestão *in vitro*

O sistema de digestão semi-dinâmico *in vitro* consistiu em três fases sequenciais: digestão gástrica e entérica, a qual é dividida em duas etapas (duodenal e jejunal) seguindo o protocolo de (BRODKORB *et al.*, 2019; MINEKUS *et al.*, 2014) com adaptações. O sistema de digestão simulada foi composto por três biorreatores de vidros termostatizados de 350 mL (BIO-T-PRO) acoplados a um controlador (BIO-TEC-PRO), placas agitadoras, bombas peristálticas, banho termostático, pHmetro e termômetro portáteis. As amostras durante o processo de digestão foram mantidas nos biorreatores em temperatura constante de 37 °C, agitação de 150 rpm e pH ideal, seguindo a programação previamente estabelecida para cada fase da digestão.

A solução gástrica simulada foi composta por Cloreto de Sódio (NaCl) 47,2 mmol, Cloreto de Potássio (KCl) 6,9 mmol, Hidrogeno Fosfato de Potássio (KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>) 0,9 mmol, Cloreto de Magnésio hexahidratado (MgCl<sub>2</sub>(H<sub>2</sub>O)<sub>6</sub>) 0,1 mmol, Bicarbonato de Sódio (NaHCO<sub>3</sub>) 25 mmol, Cloreto de Cálcio (CaCl<sub>2</sub>) 0,3g/L, pepsina 2,4 g/L - 600 U/mL (Sigma Aldrich, St. Louis, Missouri, EUA).

As soluções duodenal e jejunal foram compostas por Cloreto de Sódio (NaCl) 38,4 mmol, Cloreto de Potássio (KCl) 6,8 mmol, Hidrogeno Fosfato de Potássio (KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>) 0,64 mmol, Cloreto de Magnésio hexa-hidratado (MgCl<sub>2</sub>(H<sub>2</sub>O)<sub>6</sub>)

0,33 mmol, Bicarbonato de Sódio ( $\text{NaHCO}_3$ ) 85mmol, Cloreto de Cálcio ( $\text{CaCl}_2$ ) 0,37 g/L, pancreatina 0,9g/L - 100 U/mL (Sigma Aldrich, St. Louis, Missouri, EUA) e bile 6,0 g/L (Sigma Aldrich, St. Louis, Missouri, EUA).

Na fase gástrica, 190 mL de suco foi bombeado para o primeiro biorreator, contendo 100 mL da solução gástrica simulada. O pH foi ajustado automaticamente para  $2,3 \pm 0,2$  com HCl 3 M. Na fase duodenal, 240 mL do suco digerido na fase gástrica foi bombeado para o segundo biorreator contendo 60 mL da solução duodenal. O pH foi ajustado para  $5,0 \pm 0,1$  com NaOH 3 M. Na fase jejunal, 250 mL do suco digerido na fase duodenal foi bombeado para o terceiro biorreator contendo nele 50 mL da solução jejunal. O pH foi aumentado para  $7 \pm 0,1$  com NaOH 3 M.

O ensaio completo (fase gástrica + fase duodenal + fase jejunal) durou 6 h. As fases da digestão tiveram duração de 2 h cada, sendo 60 min de tempo permanência no biorreator e 60 min de transferência para o biorreator seguinte (simulando o movimento peristáltico do trato gastrointestinal), auxiliado pelo funcionamento das bombas peristálticas. Para análises posteriores, 10 mL do suco foi reservado para servir como controle (produto não submetido a digestão simulada). Durante as 6 h de digestão, foram coletadas 10 mL de cada fase da digestão nos tempos (0, 1 e 2 h),

**Figura 7.** Amostras do suco de acerola após cada fase da digestão *in vitro*.



#### **4.5.2 Ativação do *Lactobacillus casei***

A cepa foi cultivada em caldo. O *L. casei* B-442 foi ativado inoculando-se 1,5 mL da cultura estoque em 100 mL de caldo MRS, adicionado de 10 mL de tampão fosfato de potássio bibásico 200 mM pH 6,5 para manutenção do pH. A

ativação foi conduzida a 37 °C (aproximadamente 16 h) para atingir uma concentração de células da ordem de 10<sup>8</sup> UFC/mL (aproximadamente 6 h), equivalente a aproximadamente 0,9 de absorbância a 590 nm.

#### **4.5.3 Fermentação com o *Lacticaseibacillus casei***

O metabolismo do microrganismo foi realizado no mesmo sistema onde ocorreu a digestão, utilizando apenas um dos biorreatores. O suco digerido obtido no final da digestão foi utilizado como meio de propagação. Para avaliar o metabolismo, foi adicionado 3 mL do inóculo do probiótico *L. casei* (centrifugado e ressuspenso em 3 mL de água destilada) na concentração de 1% do suco. As condições foram as mesmas da fase jejunal da digestão: temperatura constante de 37 °C, agitação de 150 rpm e pH 7. A avaliação da propagação do *L. casei* durou 10 h para o suco *in natura* e 24 h para o prebiótico, uma vez que a fase lag no suco prebiótico se mostrou maior. Para análises posteriores, 10 mL das amostras foram coletadas a cada 2 horas no suco *in natura*, no prebiótico, as amostras foram coletadas a partir das 16 h. As amostras foram centrifugadas a 10.000 g, 10 min, 10 °C e armazenadas.

#### **4.5.4 Viabilidade do *Lacticaseibacillus casei* por contagem de células viáveis**

Para avaliar a viabilidade do probiótico nos sucos após a digestão, foram feitos plaqueamentos pelo método da gota em placas de Petri contendo meio MRS com ágar a cada 2 h de cultivo no biorreator após a digestão da fase enterica II. O material foi incubado a 37 °C durante 24 h. Decorrido o tempo de incubação, foi feita a contagem das colônias do microrganismo. Os resultados foram expressos em logaritmo de unidades formadoras de colônias por mL (log UFC/ mL).

### **4.6 Métodos analíticos**

#### **4.6.1 Compostos fenólicos totais**

A concentração de compostos fenólicos foi determinada seguindo o método de Folin-Ciocalteu (FOLIN; CIOCALTEAU, 1927) com modificações de (ALMEIDA et al., 2015). A análise foi realizada com uma mistura reacional de 10 µL da amostra, 200 µL de reagente de Folin-Ciocalteu (d = 1:10). A reação foi interrompida com 100 µL de carbonato de sódio a 20% após 3 min de reação. A

absorbância foi lida a 765 nm em espectrofotômetro Epoch ELISA. Uma curva padrão de ácido gálico (10 – 800 mg/L) foi feita para expressar os resultados em mg de ácido gálico/L de suco.

#### 4.6.2 Determinação de ácidos e açúcares por HPLC-UV

A determinação por HPLC dos açúcares, dos glico-oligossacarídeos e do ácido ascórbico foi realizada pelo método relatado por ALMEIDA *et al.* (2015). As amostras foram filtradas em membrana de éster de celulose de membrana de 0,45 mm HA (13 mm de diâmetro, branco, liso) antes da injeção. As análises por HPLC foram realizadas em um sistema LC quaternário 1260 Infinity (Agilent technologies, EUA) equipado com um sistema quaternário de bombas e detector de índice de refração e UV-VIS. Os compostos foram separados na coluna Aminex HPX-87H (300 ~ 7,8 mm) (BIORAD) termostaticada a 50 °C. O volume de injeção foi de 20 µL. A fase móvel foi uma solução de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 5 mM. A determinação do ácido ascórbico, sacarose, glicose e frutose foi baseada nas curvas de calibração obtidas, em diferentes concentrações. O pico dos glico-oligossacarídeos foi identificado e suas concentrações foram obtidas com base nos resultados encontrados nos balanços de massa da digestão e pela curva de calibração da glicose, pois não há um padrão disponível para eles. A detecção foi realizada a 240 nm.

As concentrações de ácido orgânicos e ácidos graxos de cadeia curtas foram determinadas como descrito para açúcares e oligossacarídeos. Contudo, a temperatura da coluna foi de 65 °C, o detector utilizado foi UV 210 nm e o volume de injeção foi de 60 µL. A identificação do ácido orgânicos foi realizada comparando o tempo de retenção e o espectro de absorção visível no UV com o padrão de referência do ácido propiônico, butirico, isobutirico e láctico a 99% (Sigma). A quantificação foi realizada por uma curva de calibração de cada ácido ( $R^2 = 99\%$ ).

#### 4.6.3 Quantificação de glico-oligossacarídeos durante a digestão

Os oligossacarídeos prebióticos durante a digestão foram calculados por balanço de massa, de acordo com as equações a seguir:

$$A_T \text{ (g/L)} = \text{Gli}_f + \text{Frut}_f + \text{Sacar}_f \quad (1)$$

$$\text{Oligo}_T \text{ (g/L)} = A_T - \text{Dextr} \quad (2)$$

Onde,

$A_T$  - Açúcares totais;  $Sac_f$  – Sacarose final;  $Frut_f$  – Frutose final;  $Glic_f$  – Glicose final;  $Oligo_t$  – Oligossacarídeos totais;  $Dext_T$  – Dextrana total.

Os oligossacarídeos foram calculados em cada uma das 3 fases da digestão, nos tempos 0 h, 1 h e 2 h. A determinação dos oligossacarídeos durante o metabolismo do probiótico foi determinada por HPLC como descrito no tópico anterior.

#### **4.6.4 Atividade enzimática da Dextrana-Sacarase**

Para a determinação da atividade da enzima dextrana sacarase, o substrato foi uma solução 10% de sacarose (600 g/L) dissolvida em um tampão de acetato de sódio 20 mM (pH 5,2) contendo  $CaCl_2$  (0,05 g/L e 1,2 g/L) (RODRIGUES *et al.*, 2005). A atividade enzimática foi determinada pela quantificação da taxa inicial de liberação de açúcares redutores pelo método DNS de MILLER (1959).

#### **4.6.5 Determinação da dextrana**

A dextrana foi precipitada pela adição de três volumes de etanol 96% (v/v) e determinada segundo o método fenol ácido sulfúrico para determinação de carboidratos totais (DUBOIS *et al.*, 1956).

#### **4.6.6 Análises estatísticas**

As análises foram realizadas em triplicata. Os dados obtidos foram submetidos a análise de variância ao nível de confiança de 95 % utilizando o programa Statistica versão 10, quando necessário. Os resultados foram expressos como média  $\pm$  desvio padrão.

## 5 RESULTADOS E DISCUSSÕES

### 5.1 Caracterização dos sucos de acerola

O suco de acerola utilizado como matéria prima para os sucos prebióticos continha 1,77 g/L de glicose e 1,94 g/L de frutose. Devido à baixa concentração de açúcares, foram adicionados sacarose e açúcares redutores até atingir a concentração de 75 g/L cada. Os açúcares redutores foram ajustados em proporções equimolares de glicose e frutose (1:1). Essas concentrações foram escolhidas a partir do trabalho de ARAÚJO *et al.* (2015), pois foi encontrada alta conversão de açúcar em oligossacarídeos (>80%) após 24 h de síntese enzimática. Entretanto, se observou também que após 6 horas toda a sacarose já havia sido consumida, dessa forma neste trabalho a síntese foi realizada em 6 horas para evitar a exposição da vitamina C. Após a síntese, a concentração nos sucos de glico-oligossacarídeos variou entre 64 g/L – 75 g/L e de dextrana variou entre 15 g/L – 19 g/L.

Atualmente, não existe uma legislação referente ao consumo específico de glico-oligossacarídeos e dextrana, para promover o efeito prebiótico. No entanto, utilizando como base os valores sugeridos pela legislação para compostos com propriedades prebióticas, como fibras alimentares e fruto-oligossacarídeos (FOS), os sucos produzidos nesse estudo estão acima das concentrações indicadas pela legislação para fibras e, assim, poderiam conferir efeitos benéficos à saúde se consumidos regularmente. De acordo com as alegações de propriedades funcionais e/ou de saúde, da ANVISA, os FOS podem ser utilizados desde que a recomendação de consumo diário do produto pronto para consumo forneça, no mínimo, 5 gramas de FOS, sendo que a porção deve fornecer, no mínimo, 2,5 gramas (Agência Nacional de Vigilância Sanitária, 2019).

Entretanto, como dito anteriormente, apenas a presença dos prebióticos no suco não é suficiente para afirmar sobre os seus efeitos benéficos, é necessário avaliar sua resistência ao processo de digestão e sua capacidade de promover o metabolismo de linhagens probióticas.

## 5.2 Efeitos da digestão dinâmica nos compostos dos sucos de acerola

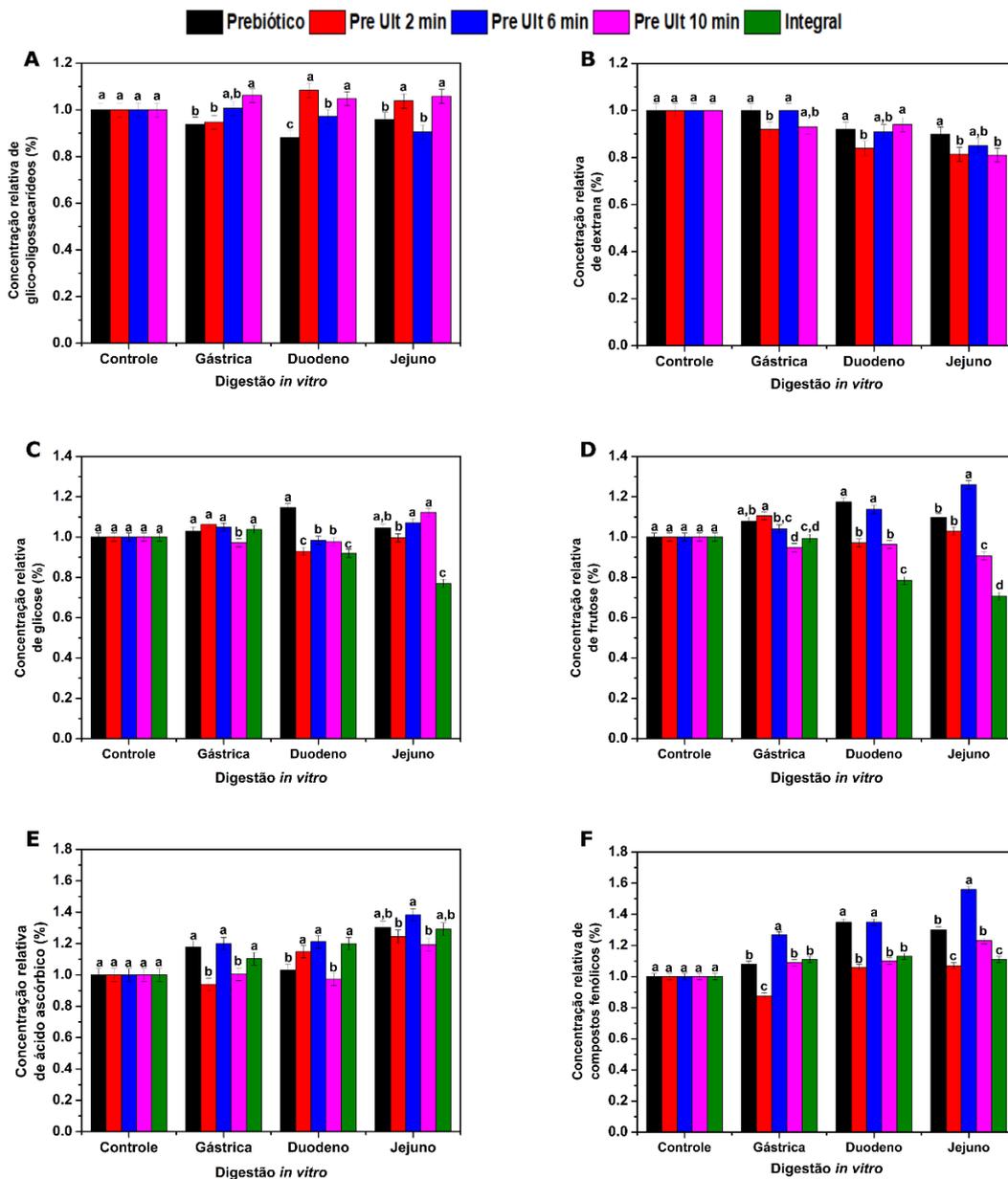
Modelos de digestão *in vitro* permitem avaliar a resistência de compostos funcionais e prebióticos às diversas condições do trato digestivo (acidez gástrica, ácidos biliares e enzimas digestivas). Os métodos semi-dinâmico de digestão *in vitro* se destinam a serem mais realistas e permitem a análise de importantes eventos que ocorrem durante a digestão gastrointestinal por exemplo, gradientes de pH e a adição gradual de fluido gástrico, como bem como esvaziamento gástrico contínuo (SHANI-LEVI *et al.*, 2017). Neste tópico foi avaliado a integridade dos glico-oligossacarídeos, dextrana, vitamina C e compostos fenólicos. A Fig. 8 mostra a resistência dos compostos funcionais e ingredientes prebióticos do suco de acerola ao longo dos estágios de digestão simulada.

### 5.2.1 Resistência dos glico-oligossacarídeos e dextrana

Os oligossacarídeos são ingredientes seletivamente fermentados pelas bactérias intestinais que alteram especificamente a composição e/ou atividade da microbiota gastrointestinal, conferindo benefícios à saúde do hospedeiro (GIBSON *et al.*, 2017). Entre os polissacarídeos, as dextranas são homopolissacarídeos de unidades de D-glicose com ligações  $\alpha$ -1,6 nas cadeias principais e cadeias ramificadas com ligações  $\alpha$ -1,2,  $\alpha$ -1,3 ou  $\alpha$ -1,4. Espera-se, que a dextrana se comporte como ingrediente prebiótico, assim como os oligossacarídeos (AMARETTI *et al.*, 2020). Para que esses ingredientes possam exercer efeitos prebióticos, é necessário que seja mantida sua integridade ao longo do trato digestivo.

Amostras de sucos de acerola contendo glico-oligossacarídeos e dextrana e processadas por ultrassom, foram submetidas a ensaios de digestão *in vitro*, em um sistema semi-dinâmico com temperatura, agitação e pH controlados. Os resultados das concentrações relativas de glico-oligossacarídeos e dextrana, ao longo da digestão, estão evidenciados na figura 8.

**Figura 8.** Concentração relativa de A) Glico-oligosacarídeos, B) Dextrana, C) Glicose, D) Frutose, E) Ácido ascórbico e F) Compostos fenólicos nos sucos de acerola através da digestão *in vitro*. De acordo com o teste de Tukey, os valores da coluna com a mesma letra não são significativamente diferentes em relação as fases da digestão ( $p < 0,05$ ).



A Fig. 8A mostra os resultados para a concentração relativa de glico-oligossacarídeos ao longo do processo de digestão. O conteúdo de glico-oligossacarídeos apresentou alterações ao longo do processo de digestão ( $p < 0,05$ ). Esse carboidrato resistiu às condições gastrointestinais simuladas, como mudanças no pH, acidez gástrica, ácidos biliares e enzimas digestivas (HU *et al.*, 2020). Os sucos 3 e 5 apresentaram as maiores concentrações relativas, enquanto que os sucos 2 e 4 apresentaram as menores concentrações relativas de glico-oligossacarídeos ao final da digestão simulada ( $p < 0,05$ ). As concentrações relativas de glico-oligossacarídeos no final da digestão foram (96%), (100%), (90%) e (103%), para os sucos 2, 3, 4 e 5, respectivamente. A manutenção da concentração dos glico-oligossacarídeos pode ser atribuído à hidrólise de dextrana (AMARETTI *et al.*, 2020).

A Fig. 8B mostra os resultados para a concentração relativa de dextrana ao longo do processo de digestão. Dextrana também manteve a maior parte de sua concentração apresentando boa resistência às condições gastrointestinais (GRUNDY *et al.*, 2016). Todas as amostras apresentaram reduções no conteúdo de dextrana ao longo do processo de digestão ( $p < 0,05$ ). Os sucos 3 e 5 apresentaram as menores concentrações de dextrana ao final da digestão ( $p < 0,05$ ). As concentrações relativas finais foram (90%), (81%), (85%) e (81%) para os sucos 2, 3, 4 e 5, respectivamente.

A importância dos prebióticos manterem sua integridade vem do fato de alguns autores apontarem que os efeitos prebióticos são devido a presença das ligações glicosídicas  $\alpha/\beta$ -1,6,  $\alpha/\beta$ -1,1,  $\alpha$ -1,2 e  $\alpha$ -1,3 (LI *et al.*, 2019; PLOU *et al.*, 2002). Os glico-oligossacarídeos e dextrana deste trabalho foram sintetizados pela enzima dextrana-sacarase de *Leuconostoc mesenteroides* com ligações glicosídicas majoritariamente  $\alpha$ -1,6. Essas ligações glicosídicas podem ser as responsáveis pela integridade dos glico-oligossacarídeos e dextrana ao final da digestão, por essas ligações serem menos suscetíveis a ação de enzimas digestivas e sofrerem hidrólise mais lenta (HU *et al.*, 2020).

Os processamentos por ultrassom de alta intensidade utilizados nesse trabalho aumentaram as concentrações de glico-oligossacarídeos nos sucos ao final da digestão *in vitro*. O processamento por ultrassom por 10 minutos apresentou o maior aumento de concentração em relação ao controle ( $p < 0,05$ ). Esse resultado está em concordância com os resultados das concentrações de dextrana, onde o

ultrassom reduziu as concentrações de dextrana nos sucos ao final da digestão *in vitro*. O processamento por ultrassom por 10 minutos apresentou a maior redução da concentração em relação ao controle ( $p < 0,05$ ).

A premissa funcional dos oligossacarídeos prebióticos são difíceis de ser hidrolisados por enzimas no aparelho digestivo, mas podem ser metabolizados por bactérias benéficas no cólon, incluindo algumas espécies de *Lactobacillus casei* e gêneros associados. Ainda assim, as enzimas digestivas tendem a hidrolisar primeiramente polissacarídeos, por apresentarem cadeias mais longas. Além disso, o processamento por ultrassom de alta potência, em sistemas alimentares fluidos, como sucos, pode causar efeitos estruturais como: alterações na conformação de polissacarídeos do suco, moléculas com alto grau de polimerização (AMARETTI *et al.*, 2020; JOVANOVIĆ-MALINOVSKA; KUZMANOVA; WINKELHAUSEN, 2015; ZINOVIADOU *et al.*, 2015). Isso pode explicar a maior hidrólise da dextrana em comparação aos glico-oligossacarídeos ao longo da digestão. Além disso, uma vez que a dextrana é hidrolisada em cadeias menores, pode formar glico-oligossacarídeos (Fig. 8A), glicose (Fig. 8C) e frutose (Fig. 8D), o que é responsável pela manutenção de suas concentrações.

As modificações estruturais obtidas podem ou não ser desejáveis no processamento de alimentos, muitas são as variáveis podem influenciar como o tipo de processamento, aumento ou diminuição da consistência/textura, presença de fibras, matriz alimentar, entre outras.

### **5.2.2 Bioacessibilidade da vitamina C, compostos fenólicos e atividades antioxidantes**

O ácido ascórbico e os compostos fenólicos são abundantes em vegetais e frutas e são fontes naturais de antioxidantes, protegendo as células de danos oxidativos. Para isso, é necessário que tais compostos estejam bioacessíveis. A bioacessibilidade refere-se à quantidade liberada de compostos bioativos disponíveis para serem absorvidos pelo trato intestinal após a digestão. Compostos funcionais, como vitamina C e compostos fenólicos, podem ser degradados e/ou convertidos em outros compostos devido à variação do pH e à atividade enzimática durante a digestão gastrointestinal, o que pode afetar sua atividade biológica (XIE; CHEN; FU, 2021).

A Fig. 8E mostra os resultados da concentração relativa de ácido ascórbico ao longo do processo de digestão. O ácido ascórbico resistiu às condições gastrointestinais simuladas. Ao longo da digestão, ocorreram aumentos significativos nas concentrações de ácido ascórbico em todas as amostras de suco ( $p < 0,05$ ). Os sucos 1 e 4 apresentaram as maiores concentrações relativas de ácido ascórbico em todas as fases da digestão ( $p < 0,05$ ). As concentrações relativas finais foram (144%), (125%), (120%), (138%) e (119%) para os sucos 1, 2, 3, 4 e 5, respectivamente, de sua concentração inicial.

A Fig. 8F mostra os resultados para a concentração relativa de compostos fenólicos ao longo do processo de digestão. Os compostos fenólicos também resistem a condições gastrointestinais simuladas. Ao longo da digestão, ocorreram aumentos significativos nas concentrações de compostos fenólicos em todas as amostras de suco ( $p < 0,05$ ). O suco 4 apresentou a maior concentração relativa de compostos fenólicos ( $p < 0,05$ ) em todas as fases da digestão. As concentrações relativas finais foram (111%), (130%), (107%), (156%) e (123%) para os sucos 1, 2, 3, 4 e 5, respectivamente, de sua concentração inicial.

Os processamentos por ultrassom de alta intensidade utilizados nesse trabalho aumentaram as concentrações de vitamina C nos sucos ao final da digestão *in vitro*. O processamento por ultrassom por 6 minutos apresentou o maior aumento de concentração em relação ao controle ( $p < 0,05$ ). Esse resultado está em concordância com os resultados das concentrações de compostos fenólicos, onde o ultrassom aumentou as concentrações de compostos fenólicos nos sucos ao final da digestão *in vitro*. O processamento por ultrassom por 6 minutos apresentou o maior aumento da concentração em relação ao controle ( $p < 0,05$ ).

O aumento do ácido ascórbico e dos compostos fenólicos pode ser atribuído à atividade de enzimas digestivas em macromoléculas e alguns flavonóides de alto peso molecular degradados a outros compostos bioacessíveis, aumentando sua concentração (AGUILLÓN-OSMA *et al.*, 2019). Também é possível atribuir o aumento do ácido ascórbico e dos compostos fenólicos ao aumento da eficiência da extração por ultrassom, causando rompimento das paredes celulares e liberação de compostos polifenólicos ligados. Outra explicação poderia ser a possível ligação de radicais hidroxila ao anel aromático de compostos fenólicos produzidos durante o ultrassom (SANTOS; RODRIGUES; FERNANDES, 2018; WANG; VANGA; RAGHAVAN, 2019).

Vitamina C e compostos fenólicos são abundantes em frutas cítricas como a acerola, e são fontes naturais de antioxidantes que atuam na proteção das células contra o dano oxidativo. Os resultados encontrados neste trabalho evidenciam que a dextrana e os glico-oligossacarídeos podem atuar na proteção de compostos bioativos como encapsulantes, favorecendo a atividades antioxidantes, o que explica a resistência e aumento da vitamina C e compostos fenólicos ao longo da digestão (ZABOT *et al.*, 2016).

### **5.3 Efeito dos sucos de acerola no metabolismo do *Lacticaseibacillus casei***

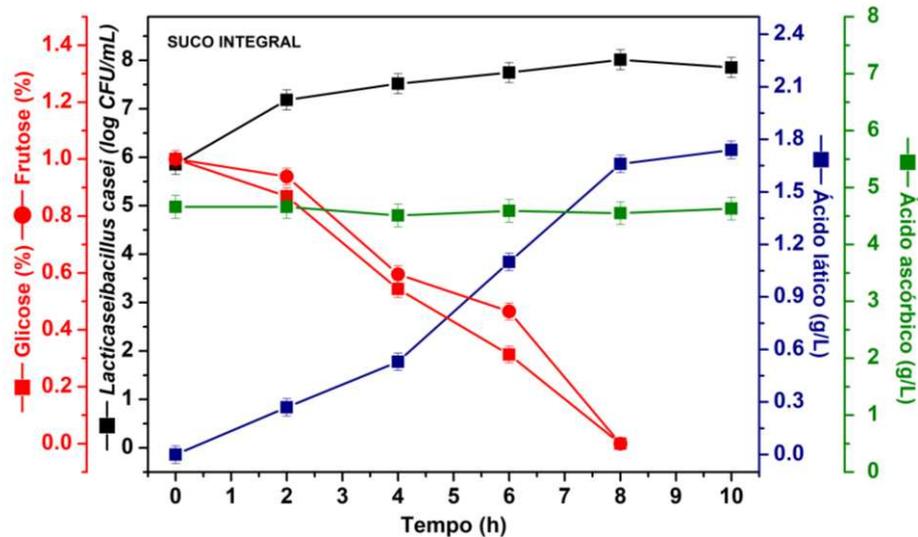
Como já mencionado anteriormente, para que um carboidrato seja considerado prebiótico ele não deve ser digerido por enzimas digestivas, não ser absorvido na porção superior do trato gastrointestinal e ser seletivamente fermentado pela microbiota do cólon (HU *et al.*, 2020).

Uma vez observado que os glico-oligossacarídeos e dextrana resistiram bem as condições gastrointestinais simuladas, foi avaliado seu efeito sob a cultura probiótica, *Lacticaseibacillus casei*. A avaliação dos efeitos dos sucos no *L. casei* ocorreu em um sistema semi-dinâmico composto por um biorreator de vidros termostatizados acoplado a um controlador (BIO-TEC-PRO). Os sucos digeridos foram incubados a 37 °C por 24 h a 150 rpm na presença do probiótico *Lacticaseibacillus casei* 1% (v/v). Os resultados a seguir mostram o comportamento do *L. casei* na presença dos ingredientes prebióticos que alcançaram a simulação da parte inferior do intestino.

#### **5.3.1 Efeito do suco integral no *Lacticaseibacillus casei***

A avaliação dos efeitos do suco no *L. casei* foi avaliada pela contagem de células viáveis e expresso em ( $\log$  UFC/mL) e produção de lático. A figura 9 mostra o metabolismo do *L. casei* na presença do suco integral digerido em relação ao consumo de açúcares.

**Figura 9.** Contagem de células viáveis do *Lacticaseibacillus casei* (log UFC/mL), consumo de substrato (%) e concentração de ácido lático e ascórbico (g/L) no suco 1 (suco de acerola não prebiótico após digestão *in vitro*).



O metabolismo de probióticos pode ser estimulado por açúcares, carboidratos complexos (poli – polissacarídeos) e condições ideais de temperatura e pH. A Figura 9 mostra o Contagem de células viáveis do *Lacticaseibacillus casei* (log UFC/mL), consumo de substrato (%), ácido lático e ascórbico (g/L) no suco 1 (suco de acerola não prebiótico). Ambos os açúcares (glicose e frutose) foram consumidos simultaneamente e esgotados após 8 horas de incubação. No mesmo tempo, a maior estimulação da multiplicação de células viáveis foi de 8,01 log UFC/mL (contagem inicial = 5,85 log UFC/mL), o que equivale a um aumento de 37%.

O microrganismo probiótico produziu 1,74 g/L de ácido lático após 10 h de incubação. A bactéria *L. casei* produz 2 mol de ácido lático/mol de glicose fermentado pela via Embden-Meyerhof-Parnas (RODRIGUES *et al.*, 2019). Este resultado nos diz que *L. casei* pode crescer e produzir ácido lático mesmo com baixas concentrações de açúcar. Nenhum ácido graxo de cadeia curta (ácido acético, propiônico, butírico e isobutírico) foi detectado no caldo fermentado. O ácido ascórbico permaneceu estável em 4,6 g/L durante toda a incubação (10 h). A incubação foi finalizada em 10 horas devido ao esgotamento total de glicose e frutose.

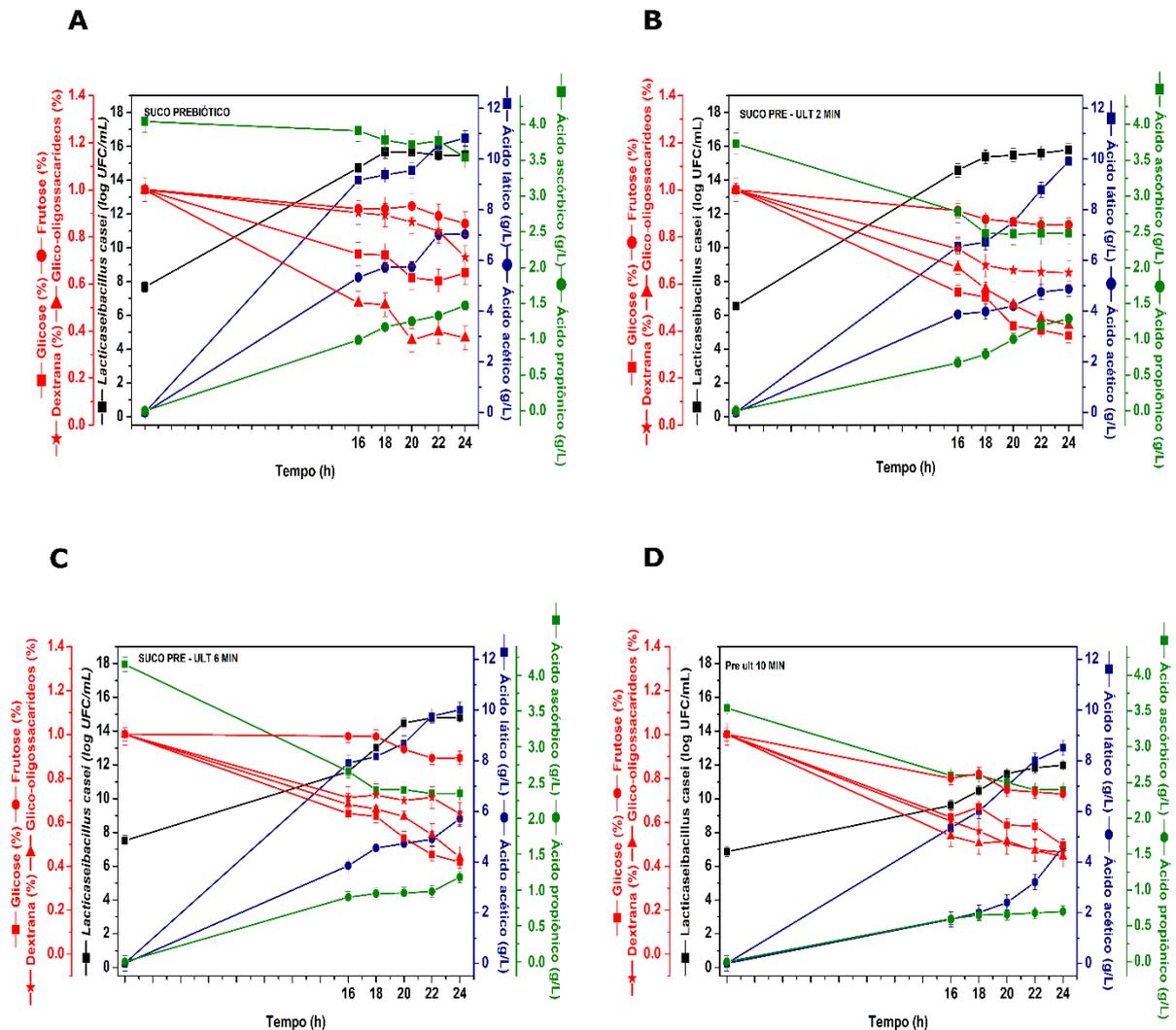
### 5.3.2 Efeito dos sucos contendo glico-oligossacarídeos e dextrana processados por ultrassom de alta intensidade no *Lactocaseibacillus casei* nos sucos processados

Os demais sucos estudados são compostos por fontes alternativas de substratos que podem apresentar potencial prebiótico estimulando o metabolismo do probiótico (glico-oligossacarídeos e dextrana). Além disso, o ultrassom foi utilizado nos sucos prebióticos para avaliar seu efeito na modulação da atividade probiótica. A Fig. 10 mostra o *Contagem de células viáveis do Lactocaseibacillus casei* (log UFC/mL), consumo de substrato (%), concentração de ácido ascórbico (g/L), ácido láctico e produção de SCFAs (g/L) em sucos prebióticos processados por ultrassom.

Os sucos contendo glico-oligossacarídeos e dextrana, carboidratos complexos, e maiores concentrações de glicose e frutose aumentaram o tempo de incubação do probiótico para 24 h, o que tornou necessário fazer a incubação por overnight. A Fig. 10A mostra os resultados para o suco 2 (suco prebiótico), composto por açúcares simples (glicose e frutose), glico-oligossacarídeos e dextrana. O *L. casei* apresentou uma contagem de células máxima igual a 15,67 log UFC/mL, às 18 h de incubação (contagem inicial = 7,68 log UFC/mL), o que equivale a um aumento de 100%. A estimulação do metabolismo do probiótico foi associado ao consumo dos quatro substratos simultaneamente. Porém, apesar do consumo simultâneo, *L. casei* consumiu preferencialmente glico-oligossacarídeos (VERGARA *et al.*, 2010). Após 24h de incubação, o consumo final foi de 63% de glico-oligossacarídeos, 35% de glicose, 29% de dextrana e 15% de frutose. O consumo de glico-oligossacarídeos e dextrana durante a fermentação pode ser explicado pela atividade de proteínas na membrana ou parede celular de bactérias lácticas.

Em um estudo recente, avaliou-se, em sistema *in vitro* de fermentação, que a glicose residual foi metabolizada inicialmente pelo *L. casei* e os glico-oligossacarídeos contribuíram posteriormente para a multiplicação do microrganismo. Os resultados corroboram com os encontrados e demonstram o potencial dos glico-oligossacarídeos como eficientes prebióticos (LI, NING *et al.*, 2019).

**Figura 10.** Contagem de células viáveis do *Lactocaseibacillus casei* (log UFC/mL), consumo de substrato (%), concentração de ácido ascórbico (g/L), ácido láctico e produção de SCFAs (g/L) em sucos de acerola prebióticos processados por ultrassom de alta intensidade. A) Suco 2 (suco prebiótico), B) Suco 3 (suco prebiótico HIUS 2 min), C) Suco 4 (suco prebiótico HIUS 6 min) e D) Suco 5 (suco prebiótico HIUS 10 min).



Um estudo recente publicado pelo nosso grupo, observou-se que o suco de caju contendo glico-oligosacarídeos, dextrana e tagatose foi resistente a condições gastrointestinais simuladas e estimulou o metabolismo de cepas probióticas em um sistema estático sem controle de pH e agitação. No entanto, cada microrganismo teve um comportamento e preferências diferentes no consumo de carboidratos. *Lactocaseibacillus casei* consumiu os glico-oligosacarídeos e dextrana simultaneamente até que a taxa máxima de multiplicação de células viáveis foi

atingida (24 h). O presente estudo confirma o efeito prebiótico dos glico-oligosacarídeos e dextrana (que ainda são poucos estudados), sua capacidade de induzir o metabolismo bacteriano e melhorar a multiplicação de células do *Lacticaseibacillus casei* (LEITE *et al.*, 2021).

Como dito anteriormente, o ácido láctico é o principal metabólico produzido pela *L. casei*. Porém, além dele, também são produzidos outros metabólitos como os ácidos graxos de cadeia curta (AGCCs). OS AGCCs são os produtos da fermentação bacteriana de fibras alimentares não digeridas no trato superior e são mediadores de um dos mecanismos pelos quais a microbiota intestinal afeta a saúde dos indivíduos (NAGPAL *et al.*, 2018).

A figura 10A mostra que o *L. casei* no suco prebiótico produziu uma concentração maior de ácido láctico em comparação ao integral, devido a maior concentração de diferentes fontes de carbono e maior quantidade de células viáveis microbiano. A concentração máxima foi de 10,83 g/L de ácido láctico em 24 h de incubação. Diferentemente do suco integral, no prebiótico foi observado a presença dos AGCCs, ácido acético e propiônico. Não foi possível detectar os ácidos butírico e isobutírico. A concentração máxima encontrada foi de 7,03 g/L de ácido acético e 1,47 g/L de ácido propiônico, em 24 h de incubação.

Esses dois AGCCs desempenham papéis importantes na saúde humana. A produção de ácido propiônico pode influenciar o peso corporal e o metabolismo, uma vez que foi demonstrado que o aumento da entrega de propionato ao cólon modula a liberação de hormônio intestinal, reduz a ingestão de alimentos em indivíduos saudáveis e previne o ganho de peso a longo prazo. O acetato é responsável por promover a lipogênese e a colesterogênese, que por sua vez são inibidas pelo propionato. A proporção acetato-propionato (75:15 em dietas ricas em fibras dietéticas) no cólon foi proposta como um determinante útil da contribuição desses dois AGCCS para a taxa metabólica e os estoques de lipídios (MORRISON; PRESTON, 2016).

Os valores de ácido ascórbico (vitamina C) ao longo da fermentação do *L. casei* foram afetados no suco 2, isso se deve ao maior período de fermentação do *L. casei* e degradação por temperatura (ASCHOFF *et al.*, 2015; TIAN *et al.*, 2020). O teor do ácido ascórbico sofreu redução de 12,4% após 24h de fermentação.

Diante dos resultados obtidos, é possível concluir que a multiplicação de células do *L. casei* e a produção de metabólicos como ácidos orgânicos e ácidos

graxos de cadeia curta são fortemente afetados pela composição do suco e fontes de carbono disponíveis para consumo. Além disso, é possível afirmar que os glico-oligossacarídeos e dextrana foram parcialmente fermentados pelo *L. casei*, o que faz deles ingredientes prebióticos.

Foi evidenciado o potencial do processamento por ultrassom para aumentar a suscetibilidade dos polissacarídeos insolúveis à fermentação pela microbiota intestinal humana. O ultrassom empregado é absorvida uniformemente por suspensões e causam vibração das moléculas que criam um aquecimento pontual, rápido e uniforme. Espera-se que também possa tornar fibras insolúveis mais acessíveis às bactérias, aumentando as taxas de fermentação (CANTU-JUNGLES *et al.*, 2021).

A partir dessa evidência, o processamento por ultrassom foi testado quanto à sua capacidade de aumentar a fermentabilidade dos glico-oligossacarídeos e dextrana usando um modelo semi-dinâmico de fermentação do probiótico *L. casei*. Os sucos contendo glico-oligossacarídeos e dextrana foram processados por ultrassom 500 W por 2, 6 e 10 min a 25°C. As figuras 10 B, C e D mostram os resultados do suco processado por 2, 6 e 10 min contendo glicose, frutose, glico-oligossacarídeos e dextrana.

A figura 10B mostra os resultados do suco 3 (suco prebiótico processado por 2 min). O *L. casei* apresentou uma contagem de células máxima igual a 15,80 log UFC/mL em 24 h de incubação (contagem inicial = 6,55 log UFC/mL), o que equivale a um aumento de 141%, consumindo todos os carboidratos simultaneamente. Porém, apesar do consumo simultâneo, o probiótico consumiu preferencialmente glicose e glico-oligossacarídeos. Após 24h de incubação, o consumo final foi de 58% de glico-oligossacarídeos, 62% de glicose, 32% de dextrana e 15% de frutose. O *Lacticaseibacillus casei* produziu 9,91 g/L de ácido láctico, 4,88 g/L de ácido acético e 1,29 g/L de ácido propiônico em 24 h de incubação. A concentração de ácido ascórbico (vitamina C) foi reduzida em 33,5% após 24h de incubação.

A Fig. 10C mostra os resultados para o suco 4 (suco prebiótico processado por 6 min). O *L. casei* apresentou uma contagem de células máxima igual a 14,77 log UFC/mL em 24 h de incubação (contagem inicial = 7,48 log UFC/mL), o que equivale a um aumento de 97%, consumindo todos os carboidratos simultaneamente. Porém, apesar do consumo simultâneo, o probiótico consumiu

novamente de forma preferencial, glicose e glico-oligossacarídeos. Após 24h de incubação, o consumo final foi de 56% de glico-oligossacarídeos, 58% de glicose, 36% de dextrana e 11% de frutose. O *Lacticaseibacillus casei* produziu 10 g/L de ácido lático, 5,71 g/L de ácido acético e 1,18 g/L de ácido propiônico em 24 h de incubação. A concentração de ácido ascórbico (vitamina C) foi reduzida em 43,3% após as 24h de incubação.

A Fig. 10D mostra os resultados para o suco 5 (suco prebiótico processado por 10 min). O *L. casei* apresentou uma multiplicação de células máxima igual a 11,98 log UFC/mL em 24 h de incubação (contagem inicial = 6,84 log UFC / mL), o que equivale a um aumento de 75%, consumindo todos os carboidratos simultaneamente. Porém, apesar do consumo simultâneo, o probiótico consumiu preferencialmente glico-oligossacarídeos e dextrana. Após as 24h de incubação, o consumo final foi de 56% de glico-oligossacarídeos, 50% de glicose, 54% de dextrana e 27% de frutose. O *Lacticaseibacillus casei* produziu 8,5 g/L de ácido lático, 4,6 g/L de ácido acético e 0,7 g/L de ácido propiônico em 24 h de incubação. A concentração de ácido ascórbico (vitamina C) foi reduzida em 32% após às 24h de incubação.

Esses resultados corroboram com as evidências de que processamento por ultrassom pode provocar mudanças físico-estruturais em moléculas como a dextrana, o que poderia aumentar o acesso das bactérias a mais porções da fibra dietética, aumentando sua fermentabilidade (CANTU-JUNGLES *et al.*, 2021). Em um recente estudo, foi observado que a taxa fermentação da dextrana é mais lenta em comparação a outros prebióticos como a inulina. O que explicaria o metabolismo mais lento do *L. casei* dos sucos com maiores taxas de consumo de dextrana (AMARETTI *et al.*, 2020). Neste trabalho, os sucos que foram processados por ultrassom por maiores tempos (6 e 10 min) apresentaram menores de quantidades de células viáveis do probiótico *L. casei* em relação ao suco prebiótico processado por 2 min e o não processado.

A alteração no consumo dos substratos provocados pelo processamento por ultrassom resultou em diferentes padrões do metabolismo do *L. casei* e mudanças na produção de ácidos nos sucos processados. Estas diferenças podem ser devido ao fato dos microrganismos podem alterar suas vias metabólicas com base nos carboidratos que estão disponíveis para serem fermentados (NGUYEN; LEE; ZHOU, 2012). O processamento por ultrassom foi utilizado com sucesso sem

trazer efeitos indesejados, o que posso indicar esse processamento como uma alternativa aos processamentos convencionais.

O suco contendo glico-oligossacarídeos e dextrana processado por ultrassom por 6 minutos provocou as melhores respostas ao metabolismo do *Lactocaseibacillus casei*. Mesmo com um aumento menor na contagem de células do *L. casei* quando comparado ao suco processado por 2 minutos, foi produzido concentrações semelhantes de seus metabólicos, como ácido láctico, acético e propiônico. O processamento por ultrassom também mostrou que para aumentar a fermentabilidade da dextrana (polissacarídeo) é necessário um processamento mais longo, enquanto que para os glico-oligossacarídeos períodos mais curtos de processamento são suficientes.

A Figura 10 mostra que os produtos do metabolismo do *L. casei* foram afetados pelo processamento por ultrassom, assim como foi no seu metabolismo. Foram observadas concentrações maiores do ácido láctico e dos AGCCs no suco prebiótico não processado do que nos sucos prebióticos processados. Quanto maior o tempo de processamento, menor foram as concentrações. Isso pode ser explicado pela maior e mais lenta fermentação da dextrana, o que levou a menor multiplicação do *L. casei* e redução do seu metabolismo.

Avaliar a resistência de prebióticos e probióticos *in vivo* é caro, demorado e envolve questões de biossegurança, e por isso, geralmente emprega-se sistemas *in vitro* nos primeiros estágios de testes. Se o prebiótico e probiótico for altamente afetada por condições intestinais e/ou perde a viabilidade a um nível que compromete seus benefícios potenciais, torna-se inviável seguir para testes *in vivo*. Portanto, os sistemas *in vitro* constituem uma abordagem econômica para avaliar os potenciais. Entre estes, sistemas semi-dinâmicos e dinâmicos são preferidos devido à sua capacidade de contornar as limitações do uso de sistemas estáticos (ALMADA-ÉRIX *et al.*, 2021; MULET-CABERO *et al.*, 2020). Neste trabalho, um sistema semi-dinâmico *in vitro* foi utilizado com sucesso como uma abordagem intermediária para avaliar a resistência de ingredientes prebióticos e compostos funcionais às condições gastrointestinais simuladas e o metabolismo do *L. casei* em condições simuladas do intestino.

## 6 CONCLUSÃO

Este estudo gerou o conhecimento necessário para indicar o suco de acerola contendo glico-oligossacarídeos e dextrana como um possível prebiótico. Os glico-oligossacarídeos e dextrana resistiram as condições gastrointestinais simuladas, enquanto os compostos bioacessíveis, vitamina C e compostos fenólicos, aumentaram suas concentrações ao final da digestão *in vitro*. O processamento por ultrassom de alta intensidade aumentou a concentração de glico-oligossacarídeos em detrimento da dextrana. O processamento por ultrassom também aumentou a concentração de vitamina C e compostos fenólicos.

Os carboidratos, pós digestão *in vitro*, foram usados como substratos pela bactéria probiótica, *Lactocaseibacillus casei*. O probiótico apresentou alto consumo de glico-oligossacarídeos e dextrana, diferentes perfis de multiplicação de células viáveis e produção de ácidos orgânicos e ácidos graxos de cadeia curta com base nas fontes de carbono disponíveis para consumo. Além disso, o processamento de ultrassom causou mudanças físico-estruturais na dextrana, o que aumentou sua fermentabilidade. O suco contendo glico-oligossacarídeos e dextrana processado por ultrassom por 6 minutos provocou as melhores respostas ao metabolismo do *Lactocaseibacillus casei*.

## REFERÊNCIAS

- AGUILLÓN-OSMA, Johanny *et al.* Impact of in vitro gastrointestinal digestion on the bioaccessibility and antioxidant capacity of bioactive compounds from Passion fruit (*Passiflora edulis*) leaves and juice extracts. **Journal of Food Biochemistry** [s. l.] v. 43, n. 7, p. 1–11 , 2019.
- AHMAD, Naveed *et al.* Characterization of free and conjugated phenolic compounds in fruits of selected wild plants. **Food Chemistry** [s. l.] v. 190, p. 80–89 , 1 jan. 2016. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0308814615008122?via%3Dihub>. Acesso em: 10 set. 2019.
- ALMADA-ÉRIX, Carine 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** [s. l.] v. 183, p. 106187 , 1 abr. 2021.
- ALMEIDA, Francisca Diva Lima *et al.* Effects of atmospheric cold plasma and ozone on prebiotic orange juice. **Innovative Food Science & Emerging Technologies** [s. l.] v. 32, p. 127–135 , 1 dez. 2015. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1466856415001630>. Acesso em: 4 set. 2019.
- ALVAREZ-SUAREZ, José M. *et al.* The protective effect of acerola (*Malpighia emarginata*) against oxidative damage in human dermal fibroblasts through the improvement of antioxidant enzyme activity and mitochondrial functionality. **Food and Function** [s. l.] v. 8, n. 9, p. 3250–3258 , 2017. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1039/c7fo00859g>.
- ALVES-FILHO, Elenilson G. *et al.* Single-stage ultrasound-assisted process to extract and convert  $\alpha$ -solanine and  $\alpha$ -chaconine from potato peels into  $\beta$ -solanine and  $\beta$ -chaconine. **Biomass Conversion and Biorefinery** [s. l.] v. 8, n. 3, p. 689–697, 15 may. 2018.
- ALVES FILHO, Elenilson G. *et al.* Evaluation of plasma, high-pressure and ultrasound processing on the stability of fructooligosaccharides. **International Journal of Food Science and Technology** [s. l.] v. 51, n. 9, p. 2034–2040 , 2016.
- ALVES FILHO, Elenilson G. *et al.* Evaluation of thermal and non-thermal processing effect on non-prebiotic and prebiotic acerola juices using <sup>1</sup>H qNMR and GC–MS coupled to chemometrics. **Food Chemistry** [s. l.] v. 265, p. 23–31 , 1 nov. 2018. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S030881461830829X?via%3Dihub>. Acesso em: 4 set. 2019.
- ALZAMORA, Stella Maris *et al.* Inactivation of microorganisms. **Ultrasound technologies for food and bioprocessing**. [S.l.: s.n.], 2011. p. 321–343.
- AMARETTI, Alberto *et al.* Potential prebiotic effect of a long-chain dextran produced

by Weissella cibaria: an in vitro evaluation. **International Journal of Food Sciences and Nutrition** [s. l.] v. 71, n. 5, p. 563–571 , 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1080/09637486.2019.1711026>.

ARAÚJO, Antônia Daiana A. *et al.* Production and spouted bed drying of acerola juice containing oligosaccharides. **Food and Bioproducts Processing** [s. l.] v. 94, p. 565–571 , 1 abr. 2015. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S096030851400090X>. Acesso em: 4 set. 2019.

ASCHOFF, Julian K. *et al.* In vitro bioaccessibility of carotenoids, flavonoids, and vitamin C from differently processed oranges and orange juices [ *Citrus sinensis* (L.) osbeck]. **Journal of Agricultural and Food Chemistry** [s. l.] v. 63, n. 2, p. 578–587 , 2015.

AWAD, T.S. *et al.* Applications of ultrasound in analysis, processing and quality control of food: A review. **Food Research International** [s. l.] v. 48, n. 2, p. 410–427 , 1 out. 2012. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S096399691200141X>. Acesso em: 4 set. 2019.

BATISTA, Ana Paula *et al.* Comparison of microalgal biomass profiles as novel functional ingredient for food products. **Algal Research** [s. l.] v. 2, n. 2, p. 164–173 , 1 mar. 2013. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S2211926413000210>. Acesso em: 4 set. 2019.

BELWAL, Tarun *et al.* Phytopharmacology of Acerola (*Malpighia* spp.) and its potential as functional food. **Trends in Food Science & Technology** [s. l.] v. 74, p. 99–106 , 1 abr. 2018. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0924224417306805>. Acesso em: 13 set. 2019.

BOEING, Joana S. *et al.* Evaluation of solvent effect on the extraction of phenolic compounds and antioxidant capacities from the berries: Application of principal component analysis. **Chemistry Central Journal** [s. l.] v. 8, n. 1, p. 1–9 , 2014.

BRODKORB, André *et al.* INFOGEST static in vitro simulation of gastrointestinal food digestion. **Nature Protocols** [s. l.] v. 14, n. 4, p. 991–1014 , 2019.

CAICEDO-LOPEZ, L. H. *et al.* Effect of the in vitro gastrointestinal digestion on free-phenolic compounds and mono/oligosaccharides from *Moringa oleifera* leaves: Bioaccessibility, intestinal permeability and antioxidant capacity. **Food Research International** [s. l.] v. 120, p. 631–642 , 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2018.11.017>.

CANTU-JUNGLES, Thaisa Moro *et al.* Microwave treatment enhances human gut microbiota fermentability of isolated insoluble dietary fibers. **Food Research International** [s. l.] v. 143, n. February, p. 110293 , 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2021.110293>.1510016635.

CARBONELL-CAPELLA, Juana 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** [s. l.] v. 13, n. 2, p. 155–171 , 2014.

CEZAR, Mario *et al.* Oligosaccharide biotechnology: an approach of prebiotic revolution on the industry. , [S.d.]. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s00253-017-8564-2>. Acesso em: 23 out. 2021.

CHEMAT, Farid *et al.* Ultrasound assisted extraction of food and natural products. Mechanisms, techniques, combinations, protocols and applications. A review. **Ultrasonics Sonochemistry** [s. l.] v. 34, p. 540–560 , 1 jan. 2017.

CHEOK, C.Y. *et al.* Optimization of total monomeric anthocyanin (TMA) and total phenolic content (TPC) extractions from mangosteen (*Garcinia mangostana* Linn.) hull using ultrasonic treatments. **Industrial Crops and Products** [s. l.] v. 50, p. 1–7 , 1 out. 2013. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0926669013003610>. Acesso em: 4 set. 2019.

CLARK, Allison; MACH, Núria. Exercise-induced stress behavior, gut-microbiota-brain axis and diet: A systematic review for athletes. **Journal of the International Society of Sports Nutrition** [s. l.] v. 13, n. 1, p. 1–21 , 2016. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1186/s12970-016-0155-6>.

COELHO, Raquel Macedo Dantas *et al.* Powder lemon juice containing oligosaccharides obtained by dextransucrase acceptor reaction synthesis and dehydrated in sprouted bed. **Journal of Food Science and Technology** [s. l.] v. 52, n. 9, p. 5961–5967 , 2015.

CUNNINGHAM, Marla *et al.* Applying probiotics and prebiotics in new delivery formats – is the clinical evidence transferable? **Trends in Food Science and Technology** [s. l.] v. 112, p. 495–506 , 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2021.04.009>.

DELVA, Lemâne; SCHNEIDER, Renée Goodrich. Acerola (*Malpighia emarginata* DC): Production, Postharvest Handling, Nutrition, and Biological Activity. **Food Reviews International** [s. l.] v. 29, n. 2, p. 107–126 , 2013.

DOLAS, Rupali; SARAVANAN, Chakkaravarthi; KAUR, Barjinder Pal. Emergence and era of ultrasonic's in fruit juice preservation: A review. **Ultrasonics Sonochemistry** [s. l.] v. 58, p. 104609 , 1 nov. 2019. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S135041771930032X>. Acesso em: 5 set. 2019.

DU, Hui *et al.* Polyphenols and triterpenes from *Chaenomeles* fruits: Chemical analysis and antioxidant activities assessment. **Food Chemistry** [s. l.] v. 141, n. 4, p. 4260–4268 , 15 dez. 2013. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0308814613008868?via%3Dihub>.

Acesso em: 5 set. 2019.

DUBOIS ET AL. Colorimetric Method for Determination. **Agriculture** [s. l.] p. 350–356 , 1956. Disponível em: <http://felix.ib.usp.br/pessoal/marcos/fisio2008/PDF/PDFPRATICA/dubois.pdf>.

FERREIRA-LAZARTE, Alvaro *et al.* In Vitro Digestibility of Galactooligosaccharides: Effect of the Structural Features on Their Intestinal Degradation. **Journal of Agricultural and Food Chemistry** [s. l.] v. 67, n. 16, p. 4662–4670 , 2019.

FERRUZZI, Mario G. The influence of beverage composition on delivery of phenolic compounds from coffee and tea. **Physiology & Behavior** [s. l.] v. 100, n. 1, p. 33–41 , 26 abr. 2010. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0031938410000582?via%3Dihub>. Acesso em: 9 set. 2019.

FONTELES, Thatyane Vidal *et al.* Ultrasound processing to enhance drying of cashew apple bagasse puree: Influence on antioxidant properties and in vitro bioaccessibility of bioactive compounds. **Ultrasonics Sonochemistry** [s. l.] v. 31, p. 237–249 , 1 jul. 2016. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1350417716300049>. Acesso em: 5 set. 2019.

FONTES, Claudia P.M.L. *et al.* Development of low caloric prebiotic fruit juices by dextransucrase acceptor reaction. **Journal of Food Science and Technology** [s. l.] v. 52, n. 11, p. 7272–7280 , 2015.

FU, Xizhe *et al.* Sono-physical and sono-chemical effects of ultrasound: Primary applications in extraction and freezing operations and influence on food components. **Ultrasonics Sonochemistry** [s. l.] v. 60, p. 104726 , 1 jan. 2020. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1350417719309605#f0010>. Acesso em: 7 out. 2019.

GIBSON, Glenn 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 Publishing Group** [s. l.] v. 14 , 2017. Disponível em: [www.nature.com/nrgastro](http://www.nature.com/nrgastro). Acesso em: 20 out. 2021.

GRUNDY, Myriam M.L. *et al.* Re-evaluation of the mechanisms of dietary fibre and implications for macronutrient bioaccessibility, digestion and postprandial metabolism. **British Journal of Nutrition** [s. l.] v. 116, n. 5, p. 816–833 , 2016.

GUIMARÃES, Jonas T. *et al.* High-intensity ultrasound: A novel technology for the development of probiotic and prebiotic dairy products. **Ultrasonics Sonochemistry** [s. l.] v. 57, p. 12–21 , 1 out. 2019. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S135041771930416X>. Acesso em: 5 set. 2019.

HEINCKE, Kristin *et al.* Kinetics of the dextransucrase acceptor reaction with maltose—experimental results and modeling. **Enzyme and Microbial Technology** [s.

I.] v. 24, n. 8–9, p. 523–534 , 1 jun. 1999. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0141022998001501>. Acesso em: 5 set. 2019.

HILL, Daragh *et al.* The Lactobacillus casei group: History and health related applications. **Frontiers in Microbiology** [s. l.] v. 9, n. SEP, p. 1–12 , 2018.

HORTA, Roberta Nunes *et al.* Protective effects of acerola juice on genotoxicity induced by iron in vivo. **Genetics and Molecular Biology** [s. l.] v. 39, n. 1, p. 122–128 , mar. 2016. Disponível em: [http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S1415-47572016000100122&lng=en&tling=en](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1415-47572016000100122&lng=en&tling=en). Acesso em: 5 set. 2019.

HU, Ying *et al.* Digestibility of branched and linear  $\alpha$ -gluco-oligosaccharides in vitro and in ileal-cannulated pigs. **Food Research International** [s. l.] v. 127, n. September 2019, p. 108726 , 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2019.108726>.

HURTADO-ROMERO, Alejandra *et al.* Innovative technologies for the production of food ingredients with prebiotic potential: Modifications, applications, and validation methods. **Trends in Food Science & Technology** [s. l.] v. 104, p. 117–131 , 1 out. 2020.

JOVANOVIC-MALINOVSKA, Ruzica; KUZMANOVA, Slobodanka; WINKELHAUSEN, Eleonora. Application of ultrasound for enhanced extraction of prebiotic oligosaccharides from selected fruits and vegetables. **Ultrasonics Sonochemistry** [s. l.] v. 22, p. 446–453 , 2015. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ultsonch.2014.07.016>.

KASTL, Arthur J. *et al.* The Structure and Function of the Human Small Intestinal Microbiota: Current Understanding and Future Directions. **Cmgh** [s. l.] v. 9, n. 1, p. 33–45 , 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.jcmgh.2019.07.006>.

LEITE, Ana K.F. *et al.* Cashew apple juice containing gluco-oligosaccharides, dextran, and tagatose promotes probiotic microbial growth. **Food Bioscience** [s. l.] v. 42, n. December 2020, p. 101080 , 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.fbio.2021.101080>.

LI, Ning *et al.* High-yield synthesis of glucooligosaccharides (GIOS) as potential prebiotics from glucose: Via non-enzymatic glycosylation. **Green Chemistry** [s. l.] v. 21, n. 10, p. 2686–2698 , 2019.

MANACH, Claudine *et al.* Addressing the inter-individual variation in response to consumption of plant food bioactives: Towards a better understanding of their role in healthy aging and cardiometabolic risk reduction. **Molecular Nutrition and Food Research** [s. l.] v. 61, n. 6, p. 1–16 , 2017.

MARTIROSYAN, Danik M.; SINGH, Jaishree. A new definition of functional food by FFC: What makes a new definition unique? **Functional Foods in Health and Disease** [s. l.] v. 5, n. 6, p. 209–223 , 2015.

MILLER, Gail Lorenz. Use of Dinitrosalicylic Acid Reagent for Determination of Reducing Sugar. **Analytical Chemistry** [s. l.] v. 31, n. 3, p. 426–428 , 1959.

MINEKUS, M. *et al.* A standardised static in vitro digestion method suitable for food – an international consensus. **Food and Function** [s. l.] v. 5, n. 6, p. 1113–1124 , 2014.

MORRISON, Douglas J.; PRESTON, Tom. Formation of short chain fatty acids by the gut microbiota and their impact on human metabolism. **Gut Microbes** [s. l.] v. 7, n. 3, p. 189–200 , 2016. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1080/19490976.2015.1134082>.

MULET-CABERO, Ana-Isabel *et al.* A standardised semi-dynamic in vitro digestion method suitable for food – an international consensus. **Food & Function** [s. l.] v. 11, n. 2, p. 1702–1720 , 26 fev. 2020. Disponível em: <https://pubs.rsc.org/en/content/articlehtml/2020/fo/c9fo01293a>. Acesso em: 30 ago. 2021.

NAGPAL, Ravinder *et al.* Human-origin probiotic cocktail increases short-chain fatty acid production via modulation of mice and human gut microbiome. **Scientific Reports** [s. l.] v. 8, n. 1, p. 1–15 , 2018.

NGUYEN, Thi My Phuc; LEE, Yuan Kun; ZHOU, Weibiao. Effect of high intensity ultrasound on carbohydrate metabolism of bifidobacteria in milk fermentation. **Food Chemistry** [s. l.] v. 130, n. 4, p. 866–874 , 2012. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2011.07.108>.

NOWAK, Dariusz *et al.* Antioxidant Properties and Phenolic Compounds of Vitamin C-Rich Juices. **Journal of Food Science** [s. l.] v. 83, n. 8, p. 2237–2246 , 2018.

OLIVEIRA, Ana Flávia A. *et al.* Non-thermal combined treatments in the processing of açai (*Euterpe oleracea*) juice. **Food Chemistry** [s. l.] v. 265, p. 57–63 , 1 nov. 2018. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0308814618308938>. Acesso em: 5 set. 2019.

PLOU, Francisco J. *et al.* Glucosyltransferases acting on starch or sucrose for the synthesis of oligosaccharides. **Canadian Journal of Chemistry** [s. l.] v. 80, n. 6, p. 743–752 , 2002.

RABELO, Maria Cristiane; FONTES, Claudia P.M.L.; RODRIGUES, Sueli. Enzyme synthesis of oligosaccharides using cashew apple juice as substrate. **Bioresource Technology** [s. l.] v. 100, n. 23, p. 5574–5580 , 1 dez. 2009. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S096085240900741X?via%3Dihub>. Acesso em: 13 set. 2019.

RODRIGUES, Vivian Cristina da Cruz *et al.* Survival, metabolic status and cellular morphology of probiotics in dairy products and dietary supplement after simulated digestion. **Journal of Functional Foods** [s. l.] v. 55, p. 126–134 , 1 abr. 2019. Disponível em: [https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S1756464619300520?casa\\_tok](https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S1756464619300520?casa_tok)

en=lbCbajUsiXIAAAAA:kBkKIY4OQvTS3FDQdPm7hyX\_mtPAs3zb4YJzfdRkzFE6sU\_ltq\_fqWKWpnmdWdP1RGik41nfug#b0090. Acesso em: 10 abr. 2020.

SALVE, Akshata R.; PEGU, Kakoli; ARYA, Shalini S. Comparative assessment of high-intensity ultrasound and hydrodynamic cavitation processing on physico-chemical properties and microbial inactivation of peanut milk. **Ultrasonics Sonochemistry** [s. l.] v. 59, p. 104728 , 1 dez. 2019. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1350417719309332>. Acesso em: 5 set. 2019.

SANTOS, Valéria O.; RODRIGUES, Sueli; FERNANDES, Fabiano A.N. Improvements on the stability and vitamin content of acerola juice obtained by ultrasonic processing. **Foods** [s. l.] v. 7, n. 5, p. 1–10 , 2018.

SERAGLIO, Siluana Katia Tischer *et al.* DETERMINAÇÃO DE COMPOSTOS FENÓLICOS POR LC-MS/MS E CAPACIDADE ANTIOXIDANTE DE ACEROLA EM TRÊS ESTÁDIOS DE MATURAÇÃO COMESTÍVEIS. [S.l.]: **Opus**, 2018. 4 v. Disponível em: <http://200.19.105.203/index.php/revistacsbea/article/view/13589/9496>. Acesso em: 13 set. 2019. Ersch. unregelmäßig.

SHANI-LEVI, Carmit *et al.* Extending in vitro digestion models to specific human populations: Perspectives, practical tools and bio-relevant information. **Trends in Food Science and Technology** [s. l.] v. 60, p. 52–63 , 2017.

SHOKRYAZDAN, Parisa *et al.* Effects of prebiotics on immune system and cytokine expression. **Medical Microbiology and Immunology** [s. l.] v. 206, p. 1–9 , 2017.

SILVA, Eric Keven *et al.* Xylooligosaccharides chemical stability after high-intensity ultrasound processing of prebiotic orange juice. **Ultrasonics Sonochemistry** [s. l.] v. 63, n. December 2019, p. 104942 , 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.ultsonch.2019.104942>.

SILVA, Eric Keven; ROSA, M Thereza MG; MEIRELES, M Angela A. Ultrasound-assisted formation of emulsions stabilized by biopolymers. **Current Opinion in Food Science** [s. l.] v. 5, p. 50–59 , 1 out. 2015. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S2214799315001228>. Acesso em: 5 set. 2019.

SPOTTI, Maria Julia; CAMPANELLA, Osvaldo H. Functional modifications by physical treatments of dietary fibers used in food formulations. **Current Opinion in Food Science** [s. l.] v. 15, p. 70–78 , 1 jun. 2017.

STINCO, Carla M. *et al.* Effect of orange juices processing on the color, particle size, and bioaccessibility of carotenoids. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**[s. l.] v. 60, n. 6, p. 1447–1455 , 2012.

SUN, Mingming *et al.* Microbiota metabolite short chain fatty acids, GPCR, and inflammatory bowel diseases. **Journal of Gastroenterology** [s. l.] v. 52, n. 1, p. 1–8 , 2017.

TIAN, Xuejiao *et al.* The supplement of vitamin C facilitates L-lactic acid biosynthesis in *Lactobacillus thermophilus* A69 from sweet sorghum juice coupled with soybean hydrolysate as feedstocks. **Industrial Crops and Products** [s. l.] v. 146, n. September 2019, p. 112159 , 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2020.112159>.

TRIPATHI, M.K.; GIRI, S.K. Probiotic functional foods: Survival of probiotics during processing and storage. **Journal of Functional Foods** [s. l.] v. 9, p. 225–241 , 1 jul. 2014. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S1756464614001716>. Acesso em: 10 abr. 2020.

VERGARA, Clarice Maria de Araújo Chagas *et al.* Prebiotic effect of fermented cashew apple (*Anacardium occidentale* L) juice. **LWT - Food Science and Technology** [s. l.] v. 43, n. 1, p. 141–145 , 1 jan. 2010. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0023643809001819?via%3Dihub>. Acesso em: 13 set. 2019.

VINDEROLA, Gabriel *et al.* Correlation between in vitro and in vivo assays in selection of probiotics from traditional species of bacteria. **Trends in Food Science & Technology** [s. l.] v. 68, p. 83–90 , 1 out. 2017. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0924224416304368?via%3Dihub>. Acesso em: 10 abr. 2020.

WANG, Jin; VANGA, Sai Kranthi; RAGHAVAN, Vijaya. High-intensity ultrasound processing of kiwifruit juice: Effects on the ascorbic acid, total phenolics, flavonoids and antioxidant capacity. **LWT** [s. l.] v. 107, p. 299–307 , 1 jun. 2019. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0023643819302051>. Acesso em: 5 set. 2019.

XIE, Xing; CHEN, Chun; FU, Xiong. Study on the bioaccessibility of phenolic compounds and bioactivities of passion fruit juices from different regions in vitro digestion. **Journal of Food Processing and Preservation** [s. l.] v. 45, n. 1, p. 1–13 , 2021.

Y. ABOUL-ENEIN, Hassan; BERCZYNSKI, Pawel; KRUK, Irena. Phenolic Compounds: the Role of Redox Regulation in Neurodegenerative Disease and Cancer. **Mini-Reviews in Medicinal Chemistry** [s. l.] v. 13, n. 3, p. 385–398 , 2013.

YILDIZ, Gulcin. Application of ultrasound and high-pressure homogenization against high temperature-short time in peach juice. **Journal of Food Process Engineering** [s. l.] v. 42, n. 3, p. 1–8 , 2019.

ZABOT, Giovani L. *et al.* Replacing modified starch by inulin as prebiotic encapsulant matrix of lipophilic bioactive compounds. **Food Research International** [s. l.] v. 85, p. 26–35 , 1 jul. 2016.

ZEAITER, Zahraa *et al.* Extraction and characterization of inulin-type fructans from artichoke wastes and their effect on the growth of intestinal bacteria associated with

health. **BioMed Research International** [s. l.] v. 2019 , 2019.

ZHENG, Liyun; SUN, Da-Wen. Innovative applications of power ultrasound during food freezing processes—a review. **Trends in Food Science & Technology** [s. l.] v. 17, n. 1, p. 16–23 , 1 jan. 2006. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0924224405002220>. Acesso em: 5 set. 2019.

ZHONG, Chao *et al.* Short-Chain Cello-oligosaccharides: Intensification and Scale-up of Their Enzymatic Production and Selective Growth Promotion among Probiotic Bacteria. **Cite This: J. Agric. Food Chem** [s. l.] v. 68, p. 8567 , 2020. Disponível em: <https://dx.doi.org/10.1021/acs.jafc.0c02660>. Acesso em: 23 out. 2021.

ZINOVIADOU, Kyriaki G. *et al.* Fruit juice sonication: Implications on food safety and physicochemical and nutritional properties. **Food Research International** [s. l.] v. 77, p. 743–752 , 1 nov. 2015. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0963996915002379#s0040>. Acesso em: 17 set. 2019.